

Departamento de Farmacología y Terapéutica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

“Concentraciones nanomolares de ouabaína activan la vía intrínseca de la apoptosis en las células HeLa”

TESIS DOCTORAL

Elba Alonso Álvarez

Directores:

Dr. D. Antonio García García

Dra. Dña. M^a Francisca Cano Abad

Trabajo realizado en el Instituto Teófilo Hernando

Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, UAM

Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de La Princesa

Madrid, 2012.

ÍNDICE

Listado de abreviaturas y acrónimos

Financiación

Resumen

1. Introducción

1. Origen y caracterización de las células HeLa

2. Glicósidos cardíacos

2.1. Introducción histórica

2.2. Los digitálicos en la clínica

2.3. La ouabaína

2.3.1. Efectos orgánicos de la ouabaína

3. La bomba Na^+K^+ ATPasa

3.1. Efectos de la ouabaína en la bomba Na^+/K^+ ATPasa

4. Tipos de muerte celular

4.1. Necrosis y apoptosis

4.2. El proceso apoptótico

4.2.1. La maquinaria apoptótica: Las caspasas

4.2.1.1. Vía intrínseca o mitocondrial

4.2.1.2. Vía extrínseca o de los receptores de muerte

4.2.1.3 Convergencia de las vías

4.3. El papel de la mitocondria en la apoptosis

4.3.1. Introducción histórica

4.3.2. Estructura y composición

4.3.3. Función de la mitocondria

4.3.4. El citocromo c

- 4.4. Papel del RE en la apoptosis
 - 4.4.1. Introducción histórica
 - 4.4.2. Estructura y composición
 - 4.4.3. Función del RE
- 4.5. Funciones de la apoptosis
- 4.6. Patologías vinculadas con la apoptosis
- 4.7. Actualidad de la apoptosis

2. Objetivos

3. Métodos y Materiales

1. Métodos

- 1.1. Células HeLa
 - 1.1.1. Preparación y mantenimiento del cultivo celular
- 1.2. Estudio de los digitálicos
 - 1.2.1. Análisis de la morfología celular mediante microscopía óptica
 - 1.2.2. Análisis de la fragmentación del ADN y estudio del ciclo celular por citometría de flujo
 - 1.2.2.1. Fundamento de la citometría de flujo
 - 1.2.2.2. Fragmentación de ADN y estudio del ciclo celular
 - 1.2.3. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT
 - 1.2.4. Determinación de la activación de caspasas
 - 1.2.5. Medida de los niveles celulares de ATP
 - 1.2.6. Localización de la ouabaína en las células HeLa
 - 1.2.6.1. Microscopía confocal
 - 1.2.6.2. Localización celular del digitálico. Internalización
 - 1.2.6.3. Dianas intracelulares del digitálico

1.2.7. Microscopía de fluorescencia

1.2.7.1. Morfología y distribución mitocondrial. Potencial de membrana mitocondrial

1.2.8. Determinación del citocromo c

1.2.9. Medidas de calcio citosólico con Fura-2AM

1.3. Análisis estadístico

2. Materiales

4. Resultados

1. Efectos del digitalico ouabaína sobre la morfología de las células HeLa

2. Efectos de la ouabaína en el ciclo celular

2.1. Apoptosis en células HeLa

2.2. Efectos del empleo de concentraciones crecientes de ouabaína, durante distintos tiempos, en la apoptosis celular

3. Unión de la ouabaína a la bomba Na^+/K^+ ATPasa

4. Efectos de la ouabaína sobre la viabilidad celular

5. Manipulación de dianas celulares con diversas estrategias farmacológicas ligadas a la apoptosis

5.1. Manipulación del flujo iónico

5.2. Quelantes de calcio

5.3. Radicales libres y antioxidantes

5.4. Manipulaciones farmacológicas en el RE

5.5. Manipulaciones farmacológicas en la mitocondria

5.6. Otras manipulaciones

6. Implicación de las caspasas en la toxicidad ouabaínica

6.1. Caspasas efectoras 3/7

6.2. Vía extrínseca

6.3. Vía intrínseca

6.3.1. Efectos del Z-LEHD-FMK sobre la actividad de la caspasa-9 y la apoptosis, en presencia de ouabaína

7. Efectos de la ouabaína en la energética celular. Determinación de los niveles celulares de ATP

8. Localización celular de la ouabaína

9. Efecto de la ouabaína sobre el potencial de membrana mitocondrial

10. Efectos de la ouabaína sobre el citocromo c

11. Efectos de la ouabaína sobre la concentración citosólica de calcio

5. Discusión

6. Conclusiones

7. Bibliografía

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Difosfato de adenosina (Del inglés "*Adenosine diphosphate*")

AFU: Unidades arbitrarias de fluorescência (Del inglês "*Arbitrary fluorescence units*")

AIF: Factor inductor de apoptosis (Del inglés "*Apoptosis inducing factor*")

AM: Acetoximetil éster

Apaf-1: Factor activador de proteasas apoptóticas-1

2- APB: Borato de 2-aminoetoxidefenilo

Asp: Ácido aspártico

ATP: Adenosin trifosfato, trifosfato de adenosina (Del inglés "*Adenosine triphosphate*")

B

BAPTA-AM: Ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético-acetoximetil éster

BSA: Albúmina de suero bovino (Del inglés "*Bovine serum albumin*")

C

Ca²⁺: Ión calcio

[Ca²⁺]_c : Concentración citosólica de calcio

([Ca²⁺]_{mit}): Concentración mitocondrial de calcio

CaCl₂: Cloruro cálcico

CAD: Complejo DNasa activado por caspasa

CCDV: Canales de calcio dependientes de voltaje

CGP37157: 7-Cloro-5-(2-clorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona

CICR: Liberación de calcio inducida por calcio (Del inglés "*Calcium induced calcium release*")

CPPP: Ciclopentanoperhidrofenantreno

Cit c: Citocromo c

D

DAG: Diacilglicerol

DED: Dominio efector de muerte (Del inglés "*Death-effector domain*")

D-glucosa: Glucosa isómero dextro

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte (Del inglés "*Death-inducing signalling complex*")

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Del inglés "*Dulbecco's Modified Eagle Medium*")

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNasa: Desoxirribonucleasa

DO: Densidad óptica

E

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA-AM: Ácido etilenglicol-bis (beta-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetraacético-acetoximetil éster

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

F

FADD: Dominio de muerte asociado a Fas (Del inglés "*Fas-associated death domain*")

Fase G0/G1: Fase estado estacionario y de inicio del ciclo celular

Fase S: Fase de síntesis de ADN

Fase G2: Fase de preparación para la mitosis

Fase M: Fase de mitosis

FSC: Componente de dispersión frontal (Del inglés "*Forward scatter*")

Fura-2AM: Acetoximetil 2-[5-[bis[(acetoximetoxi-oxo-metil)metil]amino]-4-[2-[2-[bis[(acetoximetoxi-oxo-metil)metil]amino]-5-metil-fenoxi]etoxi]benzofuran-2-il]oxazol-5-carboxylato

H

h: Horas

HEPES: (N-[2-hidroxietil]-piperacino-N'-[2-ácido etanosulfónico])

I

IAPs: Proteínas inhibidoras de la apoptosis (Del inglés "*Inhibitors of apoptosis proteins*")

iCAD: Inhibidor del complejo DNasa activado por caspasa

ICE: Enzima convertidora de interleukina-1 b

iNOS: Enzima inducible óxido nítrico sintasa

InsP₃: Inositol 1, 4, 5-trifosfato

InsP₃R: Receptor de inositol 1, 4, 5-trifosfato

K

K⁺: Ión potasio

KB-R37157: 2-[2-[4-(Nitrobenciloxi)fenil]etil]isotiourea

KCl: Cloruro potásico

M

M: Molar

min: Minutos

Mg²⁺: Ión magnesio

MgCl₂: Cloruro magnésico

mM: Milimolar

MTT: Bromuro (3- [4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difenilo)

N

N₂: Nitrógeno

Na⁺: Ión sodio

NAC: N-acetil cisteína

NaCl: Cloruro sódico

Na⁺/K⁺ ATPasa: Bomba sodio potasio ATPasa

NGF: Factor de crecimiento neural (Del inglés "*Nerve growth factor*")

nM: Nanomolar

NMDG: N-metil-D-glutamina

NO: Óxido nítrico

O

OUB: Ouabaína

P

PBS: Tampón fosfato salino (Del inglés "*Phosphate buffered saline*")

PKC: Proteín cinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PPTM: Poro de permeabilidad transitoria mitocondrial

R

RE: Retículo endoplásmico

REL: Retículo endoplásmico liso

RER: Retículo endoplásmico rugoso

RLU: Unidades relativas de luminiscencia (Del inglés "*Relative luminescence units*")

ROI: Región de interés (Del inglés "*Región of interest*")

ROS: Especies reactivas de oxígeno (Del inglés "*Reactive oxygen species*")

RyR: Receptor de rianodina (Del inglés "*Ryanodine receptors*")

S

s: Segundos

SOCE: Entrada de calcio operada por depósito (Del inglés "*Store Operated Calcium Entry*")

SSC: Componente de dispersión lateral (Del inglés "*Side scatter*")

SBF: Suero bovino fetal

SC: Suero de caballo

SNC: Sistema nervioso central

St: Estaurosporina

T

TMRE: Tetrametilrodamina etil éster

TNF: Factor de necrosis tumoral

U

U73122: Inhibidor de la fosfolipasa C. Gen de 15 kD que codifica para una lipoproteína de la especie Treponema.

V

VDAC: Canal aniónico dependiente de voltaje

Z

ZLF: Z-LEHD-FMK, inhibidor de la caspasa 9. Secuencia Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-FMK.TFA

Otros:

Å: Amstrong

($\Delta\psi_m$): Potencial de membrana mitocondrial

μM : Micromolar

μm : Micra

FINANCIACIÓN

El trabajo contenido en esta Tesis ha sido financiado por:

- (1) Agencia Laín Entralgo, CM N° NDE07/09;
- (2) MICINN, SAF 2006-03589, CONSOLIDER 2010;
- (3) Fundación CIEN I.S. Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad N° PIO16/09;
- (4) RENEVAS, IS Carlos III N° R006/00260009;
- (5) CM N° S-SAL-0275-20096;
- (6) Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2007-64963);
- (7) CONSOLIDER (CSD-000005);
- (8) FIS N° PI052124;
- (9) La Caixa N° BN05-32-O;
- (10) Consolidación de grupos UAM-CAM 1004040047;
- (11) Agencia Laín Entralgo, NDG09/08;
- (12) Agencia Laín Entralgo, NDG07/9;
- (13) FIS N^a PI10/01426;

(14)Fundación Teófilo Hernando (FTH). Gracias por su continuo e inestimable apoyo.

Durante la realización de esta Tesis doctoral, la doctoranda ha sido beneficiaria de una beca de investigación predoctoral de la **Fundación Teófilo Hernando (FTH)** y de un contrato de investigación predoctoral de la **Agencia Pedro Laín Entralgo** a cargo de dos proyectos de investigación concedidos al Dr. D. Antonio García García, para la realización de investigación en el campo de las enfermedades neurodegenerativas.

En esta tesis doctoral nos propusimos esclarecer el mecanismo de acción del efecto apoptótico del glucósido cardíaco ouabaína, en células HeLa.

De los resultados obtenidos, y teniendo en cuenta todos los datos aportados anteriormente en esta memoria, podemos plantear que un posible mecanismo que podría explicar el efecto apoptótico de la ouabaína en nuestro modelo, podría tener lugar a través de un daño mitocondrial. La secuencia de eventos que conducen a la apoptosis sería la siguiente:

1. La ouabaína se une a la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática y el complejo formado se internaliza.
2. Se produce la co-localización del complejo con la mitocondria.
3. Se producen algunos cambios en la mitocondria: pierde su estructura reticular característica y modifica su distribución en el interior celular.
4. El contenido celular de ATP se reduce y la viabilidad celular se ve comprometida.
5. Se produce la salida del citocromo c desde la mitocondria al citosol.
6. Se pone en marcha la vía intrínseca de la apoptosis con la activación de la caspasa-9, iniciadora de la misma.

7. La caspasa-9 a su vez activa a las caspasas -3 y -7, efectoras de la apoptosis. Toda la maquinaria apoptótica se activa de forma irreversible.
8. Además en la literatura encontramos que la caspasa-3 rompe el InsP₃R1 del RE provocando un goteo constante de Ca²⁺ desde este depósito al citosol, que contribuye a aumentar a la apoptosis celular.
9. Por otra parte, el citocromo c liberado al citosol, amplifica la señal apoptótica mediada por Ca²⁺ ya que aumenta su liberación desde el RE al unirse al InsP₃R.

La puesta en marcha de la cascada de la apoptosis inicia el proceso con la unión del digitálico ouabaína a la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa de la membrana plasmática y la posterior internalización del complejo bomba Na⁺/K⁺ ATPasa-ouabaína que se co-localiza en la mitocondria. Esto produce una alteración de la morfología, distribución y funcionalidad mitocondrial. El potencial mitocondrial se altera y también la bioenergética se modifica, con el consiguiente descenso de los niveles celulares de ATP y la consiguiente merma en la viabilidad celular. La salida del citocromo c al citosol, como consecuencia de la apertura del poro de transición mitocondrial, forma el conocido como apoptosoma tras unirse al factor activador de la apoptosis, apaf-1, en un proceso dependiente de ATP, que activa a la caspasa-9

iniciadora de la apoptosis. Esta caspasa a su vez activa a las caspasas efectoras -3 y -7 lo que conduce a la destrucción de la célula por apoptosis. La caspasa-3 tiene como uno de sus sustratos al receptor de InsP_3 del RE el cual, tras su ruptura por esta proteasa, actuaría como un canal de goteo constante para el Ca^{2+} (Hanson y col., 2004; Nakayama y col., 2004; Szlufcik y col., 2006). Además, el citocromo c amplía la señal apoptótica mediada por la salida de Ca^{2+} desde el RE, ya que produce un vaciamiento constante de este depósito de Ca^{2+} . Esto explicaría la menor respuesta, con respecto a los controles, de las células tratadas con el digitálico a los pulsos de histamina, tanto en número de células que responden como en la magnitud de la señal de Ca^{2+} registrada.

Ya que la ouabaína se sintetiza endógenamente en los mamíferos, incluida la especie humana, y que se detectan niveles de la misma en la circulación, nuestra tesis sugiere que este digitálico endógeno bien pudiera tener una función reguladora de la apoptosis, particularmente en células que se dividen y diferencian con asiduidad.

I. Introducción

Marco en el que se desarrolla esta tesis doctoral

En nuestro Instituto Teófilo Hernando de I+D del medicamento (ITH) se ha utilizado frecuentemente la ouabaina como un instrumento farmacológico para inhibir la bomba Na^+/K^+ ATPasa y modificar así la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ del plasmalema para indirectamente, modificar la entrada y redistribución del Ca^{2+} en la célula. Estos estudios se han centrado, fundamentalmente, en el esclarecimiento de los finos mecanismos que regulan la liberación exocitótica de neurotransmisores.

Una segunda línea de investigación de nuestro ITH se relaciona con el estudio de los mecanismos que subyacen en la muerte de las neuronas por apoptosis o necrosis, en las enfermedades neurodegenerativas y el ictus. Con estos estudios buscamos nuevas dianas para sintetizar y desarrollar compuestos con potencial terapéutico en esas enfermedades. En esa búsqueda, nos preguntamos si la Na^+/K^+ ATPasa podría ser una nueva diana para regular la apoptosis. Por ello, emprendimos este estudio para comprender el mecanismo por el cual la ouabaina producía apoptosis a concentraciones submicromolares, en células HeLa.

1. Origen y caracterización de las células HeLa

“Roanoke, Virginia, EEUU: El 1 de agosto de 1920 y bajo el signo zodiacal de Leo, vino al mundo una mujer afroamericana que sin saberlo, cambiaría el rumbo de la investigación con cultivos celulares. Su nombre, Henrietta Lacks y su fatal destino, un cáncer de útero que terminaría con su vida el 4 de octubre de 1951 a las 12:15 a.m. en el hospital John Hopkins, cuando sólo contaba con 31 años, dejando marido y 5 hijos. La malignidad del tumor dejó atónitos a los médicos. El azar quiso que una muestra biológica de Henrietta impregnada con las letales células cayera en manos del joven médico George Gey. El sería el responsable del primer cultivo continuo de un tejido tumoral humano, la primera línea celular inmortal. Hasta entonces no se conocía ninguna célula que pudiera sobrevivir fuera del soporte vital humano y que sobrepasase el llamado “límite de Hayflick”. Gey las bautizó como HeLa pensando que provenían de otra paciente llamada Helen Lane o Harriet Lane (Gold, 1986; Cullington, 1974). Lamentablemente nunca conoció a Henrietta Lacks y tuvieron que pasar 20 años hasta que supo la verdad”.

INTRODUCCIÓN



Figura 1. Imagen de Henrietta Lacks (izquierda), quien sin saberlo y con la ayuda del Dr. Gey, revolucionó el mundo de la medicina en 1951. Derecha, fotografía de un cultivo de células del carcinoma epitelial de cérvix de Henrietta Lacks, células HeLa, que originó la primera línea celular inmortal.

Laboratorios de todo el mundo hoy día siguen trabajando con esta línea de células que partieron del tumor original hace ya 60 años. Con ellas se estableció el primer cultivo continuo, la primera línea celular inmortal. Las células HeLa no envejecen. Mientras se les proporcione el entorno adecuado, siguen creciendo y dividiéndose si tienen nutrientes, oxígeno, espacio y alguna forma de deshacerse de sus residuos. Se dividen en 24 horas y doblan su número a una velocidad sorprendente. Las HeLa, además de poseer esta característica de multiplicarse eternamente, también presentan una resistencia inusual.

INTRODUCCIÓN

Son tan agresivas que pueden contaminar un cultivo cualquiera con una sola célula HeLa (Defendi y Billingham, 1960, Brand y col., 1962). Se sospecha que su crecimiento frenético e invasivo y su resistencia se deben principalmente a una combinación de papilomavirus 18 (Meissner 1999) que produce una proteína que degrada p53 sin mutarla, y de alteraciones varias en los cromosomas 1, 3, 5 y 6. Pero lo cierto es que nadie sabe aún exactamente por qué las HeLa poseen estas características de supervivientes natas.

Las células HeLa se caracterizan por ser inmortales, no excitables ya que carecen de canales de calcio (Ca^{2+}) dependientes del voltaje (CCDV), no poseer liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} ("*Calcium Induced Calcium Release*" CICR) ni receptores de rianodina (RyR) permeables a calcio (Ca^{2+}) en el retículo endoplásmico (RE). Tampoco tienen intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su membrana plasmática, dato de especial importancia en el marco de nuestro estudio (Furman y col., 1995).

El trabajo de Gey revolucionó el mundo de la biomedicina. Equipos de todo el planeta desentrañan los procesos cancerosos y genéticos gracias a las células de Henrietta, y muchas de estas investigaciones están relacionadas con premios Nobel. Jonas Salk y sus colaboradores lograron por primera vez hacer crecer el virus de la poliomielitis en las prolíficas HeLa, lo que permitió desarrollar un test diagnóstico y la vacuna salvadora. Las HeLa también han estado

INTRODUCCIÓN

presentes en destructivos ensayos atómicos y en los primeros vuelos al espacio, comprobando su resistencia a la gravedad cero. Hoy día, no hay un banco de tejidos donde no se almacenen viales congelados con la inscripción "HeLa" o un laboratorio de cultivos donde la herencia inmortal de Henrietta no ocupe alguna botella en el incubador. Quien no las emplea para estudiar el cáncer o la fisiología celular, las utiliza como línea de control por su facilidad de cultivo y su docilidad de manejo. Los laboratorios las compran sin reparar en gastos y han contribuido a unos avances espectaculares en la medicina y la genética.

Mientras leen estas líneas, las células que sin saberlo "donó" Henrietta siguen creciendo y multiplicándose en aras de mejorar la calidad de vida de gente anónima que jamás conocerá el nombre de su benefactora.

2. Glicósidos cardíacos

Se conoce como "glicósidos cardiotónicos" a un grupo de sustancias esteroideas con actividad inotrópica positiva sobre el músculo cardíaco. Se les conoce también como "digitálicos", ya que están representados por la digoxina, obtenida de las semillas y hojas del

INTRODUCCIÓN

género *Digitalis*, punto de referencia en la historia de la terapéutica de las enfermedades del corazón.

La ouabaína, también conocida como g-estrofantina, es también un esteroide cardiotónico con propiedades farmacológicas similares a la digoxina.

Estos compuestos son incuestionablemente uno de los grupos de fármacos más valiosos de la Farmacopea.

2.1. Introducción histórica

En la antigüedad, según se recoge de las pictografías de los egipcios, ideografías en tablillas de arcilla de los babilonios y en los Vedas indios, se empleó la *Digitalis* en Euroasia, principalmente en la cuenca del Mediterráneo y en China. En el papiro de Ebers (probablemente 1500 a.C.) se recogen los remedios descritos por los egipcios donde se menciona el uso de plantas que contienen esteroides cardiotónicos del tipo *Digitalis*.

Seguidamente fue descrita por los griegos Hipócrates, médico conocido como “el padre de la medicina” (460-377 a.C.); Dioscórides (40-90 d.C.), médico y farmacólogo en cuya obra “De Materia Médica” describió y dibujó la *Digitalis*. Este libro fue la principal fuente clásica de la terminología botánica moderna y el texto más importante de

INTRODUCCIÓN

farmacología durante los 16 siglos siguientes; y Galeno (131-201 d.C.), médico y filósofo, de un gran talento investigador en la época de los romanos que también la utilizó seguido de los primeros médicos árabes.

Durante la Edad Media se usó mucho terapéuticamente, y desde el siglo X y en adelante se empleó para tratar desde resfriados hasta la epilepsia.

Aunque los clásicos representaran esta planta o apareciera en algunos de sus textos, fue en el siglo XVI cuando se denominó el género *Digitalis* por Hyeronimus Bock (conocido también como Tragus) en Estrasburgo (1539), basándose en el término latino *digitus* que significa dedo. El médico alemán Fuchsius, uno de los tres padres fundadores de la Botánica junto con Bock, en su libro “Latin herbal: Historia Stirpium” en 1542 le da la apelación latina *Digitalis purpúrea*, en alusión al término alemán “fingerhut”, que significa cubierta o protección del dedo, debido a la semejanza de las flores con el dedo de un guante. Y *purpúrea* de acuerdo a su descripción botánica de las flores entre la gama de colores del blanco al púrpura.

Las propiedades medicinales de los digitálicos no fueron conocidas hasta el siglo XVIII, cuando William Withering la presentó como un medicamento contra la hidropesía (término antiguo de edema y uno de los síntomas de la insuficiencia cardíaca) en Birmingham en 1785 en su clásico tratado titulado “Sobre la digital y su

INTRODUCCIÓN

uso en medicina" (Withering, 1785). Su descubrimiento fue gracias a un remedio a base de hierbas que una gitana de Shropshire administró a un paciente suyo enfermo del corazón que no supo como aliviarle. Withering entonces buscó a la gitana para que le dijese la fórmula de su remedio. La formulación contenía más de 20 ingredientes distintos de los cuales Withering dedujo que la digital era el principio activo de la formulación. Por aquel entonces la *Digitalis purpúrea* era considerada como un potente veneno y sólo se utilizaba externamente en la cicatrización de heridas. Diez años estuvo probando diferentes preparaciones de distintas partes de la planta y recogida en distintas épocas del año, y sus estudios recogen 163 casos donde probó la *Digitalis* y describió los efectos beneficiosos y perjudiciales de su uso. Aunque no logró saber si su acción radicaba en el corazón o en el pulmón, observó que funcionaba bien en determinadas hidropesías y que era nula en la hidrocefalia (hidropesía cerebral) y en el quiste ovárico. Por lo menos uno de los casos estudiados fue el de un paciente de su amigo Erasmus Darwin, el cual pidió una segunda opinión a Withering. En ese mismo año Darwin presentó en el Colegio de Médicos de Londres el trabajo: "Sobre el éxito del uso de la *Digitalis* en algunas hidropesías y en el pulmón" que se publicó en la revista "Medical Transactions". Hasta el año 1799 John Ferriar no determinó que el efecto observado por Withering, se debía a su acción sobre el corazón. En su monografía sobre la *Digitalis*, Ferriar describe cómo la digital enlentece

INTRODUCCIÓN

el pulso, reduciéndolo, “sin peligro desde 120 por minuto hasta 75 u 80” (Ferriar, 1799).

A principios del siglo XIX, Mathieu Orfila, químico y toxicólogo francés de origen español, considerado el fundador de la Toxicología, analizó muchos de los efectos tóxicos de la *Digitalis*. En 1855, fue Vulpian el primero en utilizar animales de experimentación para esclarecer la acción de la *Digitalis*, en vez de sólo observar los síntomas que producía. Para ello utilizó a la rana y mostró una ralentización de las aurículas y de la contractura muscular de los ventrículos. A él le siguieron otros autores como Balfour, Fothergill y Binz. Un año antes, Homolle y Querenne tras arduos esfuerzos aislaron el extracto puro de la *Digitalis*, la digitalina (Homolle y Querenne, 1854). Posteriormente Nativelle en 1869, perfeccionó el proceso de Homolle y obtuvo la digitalina cristalizada que se empleó durante varias décadas. Frazer en 1872, adjudicó la naturaleza de glicósido a los principios activos de la digital y Schmiedeberg en 1875 aisló la digitoxina de la digital y demostró que era igual a la digitalina descubierta por Nativelle.

A pesar del interés por el mecanismo de acción de la *Digitalis* y del aislamiento de digitoxina, el S. XIX fue un periodo donde se avanzó muy poco sobre su uso en terapéutica. Debido a esto el uso principal todavía era para el tratamiento de la hidropesía aunque se escribió un libro en 1877 “Neale’s Medical digest” donde se hablaba de más de 32

INTRODUCCIÓN

enfermedades en las cuales se prescribía la *Digitalis*, entre las cuales se incluían la adenitis, bronquitis, tuberculosis y fiebres tifoideas.

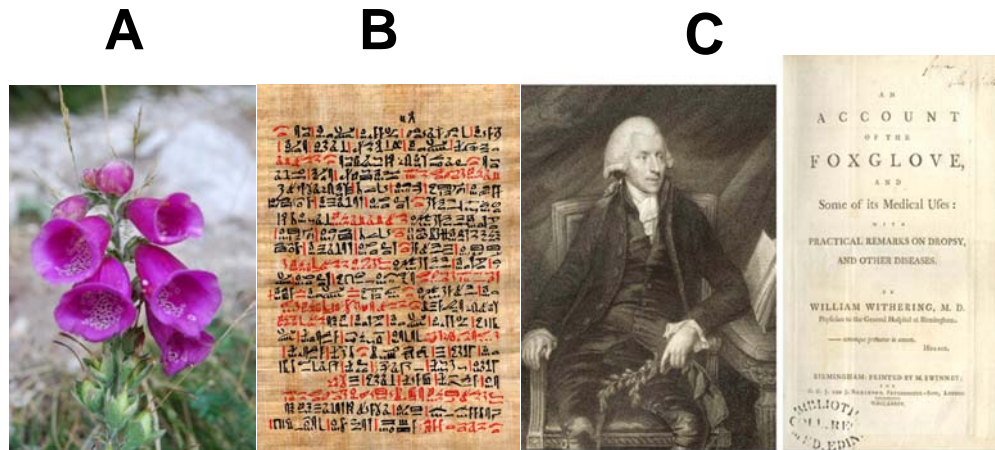


Figura 2. Imagen de una planta del género *Digitalis* (A). Imagen del papiro de Ebers que ya hacía referencia a remedios del tipo de los digitálicos (B). Fotografía de William Withering y de su tratado "Sobre la digital y su uso en medicina" (1785) (C).

A finales del siglo XIX, el efecto directo de los glicósidos cardiotónicos (nombre dado por Gerhardt en 1852) en la contractilidad cardíaca, todavía no era tenido en cuenta por la mayoría de los investigadores de la época, que prestaban más atención a las alteraciones de ritmo, el papel del sistema vagal y las contracciones sistólicas observadas en los corazones de los anfibios.

INTRODUCCIÓN

Hasta principios del siglo XX no se especifica el uso de la digital en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y se descarta su uso en la mayoría de las enfermedades citadas durante el siglo XIX. Durante este siglo hay un gran progreso en la formulación de los productos de la digital a partir de los métodos descritos previamente por Withering. Al principio hubo una gran variedad en la potencia de las píldoras y tinturas del polvo de las hojas secas de la digital, siendo imprescindible personalizarlo para cada paciente. Un importante avance fue la introducción de protocolos estandarizados de obtención de la digital por Houghton a finales del siglo anterior (1886) en la preparación de la rana. Pero aún así no se consigue una formulación muy fiable hasta el año 1930 cuando la digoxina pura fue aislada de la *Digitalis lanata* por Sydney Smith de los laboratorios Burroughs Wellcome (actualmente GlaxoSmithKline) en Dartford, Gran Bretaña. La digoxina fue más potente que la digitoxina encontrada en la *Digitalis purpúrea* por lo que los laboratorios Wellcome comercializaron este producto natural con el nombre de "Lanoxin". Este compuesto se sigue obteniendo en la actualidad de las hojas de la *Digitalis* a diferencia de otros muchos fármacos de la industria farmacéutica que son sintetizados químicamente. En concreto, en las granjas de Holanda se recogen las hojas y se mandan secas a Estados Unidos para su procesamiento. En 1969 los laboratorios decidieron mejorar la formulación sin cambiar la cantidad de digoxina, pero cambiando algunos excipientes. Esto dio lugar a una gran variabilidad en los niveles plasmáticos de digoxina en

INTRODUCCIÓN

los pacientes, ocasionando toxicidad en unos y en otros ningún efecto, lo que llevó a publicar la Farmacopea Británica en 1976 donde se precisaban los protocolos de fabricación de la digoxina y prevenir que se repitiera este problema.

Por otro lado, los resultados fueron tan beneficiosos durante la primera mitad del siglo XX en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca que llevó a Albert Szent-Györgyi en 1953, a postular la existencia de un digitálico endógeno en los mamíferos (Szent-Györgyi, 1953). En ese mismo año Schatzmann descubrió que los esteroides cardiotónicos eran inhibidores específicos de la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Schatzmann, 1953). Esto marcó el conocimiento actual del mecanismo de acción de los digitálicos. A lo que hay que unir otros dos hallazgos importantes: (1) la inyección intracelular de Ca^{2+} en el músculo esquelético producía contracción (Heilbrun y Wiercinski, 1945), y (2) el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en el axón del calamar es similar al del músculo cardíaco (Baker y col., 1959). Todo ello explicaría no sólo un aumento en la concentración intracelular de Na^+ como resultado de la inhibición de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, sino que el intercambiador, al actuar en modo reverso, aumentaría la concentración intracelular de Ca^{2+} y originaría la contracción del músculo cardíaco (Eisner y Smith, 1992). Además de este efecto inotrópico positivo, la digoxina parece ejercer una disminución de la actividad neurohumoral (inhibiendo el sistema simpático), descrita por primera vez en 1989 por Ferguson que puede

INTRODUCCIÓN

contribuir grandemente a la eficacia de los glicósidos cardiotónicos en la insuficiencia cardíaca (Ferguson y col., 1989). En cuanto a la búsqueda del digitálico endógeno, hubo que esperar hasta finales del siglo XX para que Hamlyn (1991) demostrara la existencia de un esteroide cardiotónico igual a la ouabaína en el plasma humano. Esto abre las puertas a numerosos experimentos para explicar las funciones fisiológicas y patológicas de estos “digitálicos endógenos”.

Durante el pasado siglo, a pesar de las controversias sobre la eficacia del uso de glicósidos cardiotónicos en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca con alteraciones de los ritmos sinusales, no ha habido ensayos clínicos controlados y aleatorizados sobre la eficacia y seguridad de la digoxina (el digitálico más utilizado en la clínica) hasta la década pasada. En nuestros días, la evaluación racional de estos ensayos clínicos, la aparición de nuevos fármacos alternativos, el estrecho margen terapéutico, las interacciones farmacológicas y la toxicidad de la ouabaína han restringido mucho su uso. El principal uso de los glicósidos cardiotónicos de la *Digitalis* sigue siendo en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, pero en pacientes que además tengan algunas arritmias, concretamente taquicardia causada por la fibrilación auricular. También se emplea en pacientes con insuficiencia cardíaca, pero que permanecen sintomáticos con fármacos de primera línea.

2.2. Los digitálicos en la clínica

Los digitálicos constituyen un ejemplo extraordinariamente rico de la evolución de la farmacología y la terapéutica de los últimos 200 años. Se han utilizado durante más de 200 años por sus propiedades inotrópicas positivas sobre el corazón y por disminuir la frecuencia cardíaca, en particular en pacientes con fibrilación auricular y todavía hoy continúan utilizándose en la clínica en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva.

A nivel cardíaco, incrementan la contractilidad del músculo auricular y ventricular (efecto inotrópico positivo) por la inhibición de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, lo que produce una menor salida de Na^+ durante la diástole y un aumento de su concentración intracelular. Esto produce un mayor intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que se acompaña de un aumento de la disponibilidad de Ca^{2+} en la unión actina-miosina y secundariamente de la fuerza contráctil. Este efecto representa la base para su uso terapéutico. Adicionalmente, el aumento de Na^+ intracelular puede producir cambios en el potencial de reposo, en la excitabilidad y en la velocidad de conducción de las fibras cardíacas, fenómenos que explican los efectos benéficos y tóxicos de estos fármacos. Producen también disminución de la frecuencia de descarga sinusal, debido al incremento de la actividad vagal, y de la actividad simpática refleja secundaria al efecto inotrópico positivo. Mejoran la

INTRODUCCIÓN

circulación, disminuyen la frecuencia ventricular y modifican de las propiedades eléctricas del corazón. Además producen vasodilatación y disminuyen la resistencia periférica. Como consecuencia, mejoran la eficiencia del corazón. A nivel renal, debido a la inhibición de la bomba ATPasa, los digitálicos mejoran la perfusión e incrementan la excreción de agua y sodio (Na^+).

Estos fármacos cuentan con un margen de seguridad muy estrecho y aproximadamente el 20% de los pacientes que los reciben tienen alguna manifestación de toxicidad. La intoxicación se aborda con la retirada del fármaco, o con la administración de dosis más bajas; con la administración de potasio (K^+) para elevar su concentración extracelular y desplazar así al digitálico de su unión a la bomba ATPasa; con la administración de antiarrítmicos o anticuerpos frente a los glucósidos; con atropina para interferir con la circulación entero-hepática.

Hay estudios recientes que sugieren que la digital, a través de mecanismos de señalización intracelular de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, puede tener propiedades anticancerígenas (Khan y col., 2009) incluso en los resistentes al tratamiento (Mijatovic y col., 2012) y estar implicada en los procesos de regulación del crecimiento y la diferenciación celular (Kulikov y col., 2007; Ramírez-Ortega y col., 2006), apoptosis (Akimova y col., 2005), fibrosis y modulación de la inmunidad y del metabolismo de carbohidratos (Bagrov y col., 2009). El conocimiento más profundo del

mecanismo de acción de los digitálicos permitirá ampliar las estrategias terapéuticas actuales.

2.3. La ouabaína

Como ya hemos mencionado, las propiedades farmacoterápicas de los digitálicos fueron descritas por primera vez en el siglo XVIII por William Withering, quien encontró que los extractos de *Digitalis Purpurea* eran de utilidad en el tratamiento “de la hidropesía y otros trastornos” (Withering, 1785). Sin embargo éste no ha sido el primer uso que los humanos hemos encontrado para estas sustancias: la primera referencia que se conoce sobre este compuesto es el uso que los Inées, nativos de Gabón en África Occidental, le daban como veneno para sus flechas según recoge Pélikan (Pélikan, 1865) en su estudio sobre “el veneno cardiaco” extraído de la raíz del Ouabolo (*Strophantus gratus*). La medicina tradicional china cuenta así mismo con varios ejemplos del uso terapéutico de esteroides estructuralmente emparentados con los digitálicos, si bien en su caso la fuente de obtención eran venenos de sapo (*Bufo bufo*). Los médicos musulmanes de la España del siglo VIII también conocían y utilizaban los extractos de digital (Brewer, 2004). En el siglo XIX, Ringer postuló la existencia de sustancias endógenas similares a los digitálicos que mimetizarían las acciones de éstos de forma fisiológica (Ringer, 1885). Esta idea fue recogida por científicos de

INTRODUCCIÓN

mediados del siglo XX (Szent-Györgyi, 1951), momento en el que se describe el transporte de iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática del eritrocito y se describe la acción farmacológica de los glucósidos cardiotónicos (Schatzman, 1953). Desde entonces, se han realizado múltiples avances en el conocimiento del mecanismo de acción de los digitálicos. La teoría sobre la existencia de digitálicos endógenos ha resultado ser cierta. Si bien ya se había encontrado actividad endógena “de tipo digitálico” en mamíferos (Fishman, 1979), no fue hasta 1991 cuando se identificaron y aislaron en plasma humano pequeñas cantidades de un esteroide cardiotónico indistinguible del cardenólido ouabaína derivado de la planta, por lo que se le llamó “ouabaína endógena” (Hamlyn y col., 1991).

La ouabaína es una hormona circulante (Hamlyn y col., 1991; Hamlyn y col., 1998; Kawamura y col., 1999; Koniya y col., 2001) de acción rápida, la cual se halla presente en varias especies. Esta ouabaína endógena se ha aislado en glándulas adrenales (Schneider y col., 1998; Hamlyn y col., 1991; Ludens y col., 1992; Laredo y col., 1994; Laredo y col., 1997) e hipotálamo bovinos (Yamada y col., 1992; Tymiak y col., 1993; Li y col., 1998; Kawamura y col., 1999), tejidos ricos en este compuesto, y en células adrenomedulares de rata (Ferrandi y col., 1993; Komiyama y col., 2001). De hecho, la glándula adrenal y el hipotálamo son considerados lugares de síntesis de ouabaína (Komiyama y col., 2001; el-Marsi y col., 2002; Murrel y col., 2005). Tiene una vida media,

INTRODUCCIÓN

IC50, de 5 a 8 minutos y es eliminada por el hígado (Antolovic y col., 2000) y la orina (De Angelis y col., 1997). Es secretada humoralmente, por el ejercicio (Antolovic y col., 2000) y la hipoxia (De Angelis y col., 1998), por medio de sistemas todavía desconocidos. Además de la ouabaína se ha demostrado la síntesis de otros cardiotónicos endógenos como marinobufagenina (Bagrov y col., 1998), bufalín (Schoner y col., 1992), 19-norbufalina (Manunta y col., 1994) y proscillaridina A (Schoner y col., 1992)). Aunque se ha demostrado la presencia de digoxina en plasma, orina, adrenales y algunos quistes (Kitano y col., 1998; Xie y col., 2002), no hay pruebas de que ésta sea secretada de manera endógena.

Los digitálicos son compuestos de origen natural que poseen un núcleo esteroide, un grupo lactónico insaturado y varios azúcares. La estructura química de la ouabaína (**Figura 3**), más propia de vegetales que de animales, hizo cuestionarse la veracidad de estos hallazgos: la ouabaína del plasma podría provenir de la dieta y era improbable su significado fisiológico a concentraciones picomolares (Hansen, 2003).

INTRODUCCIÓN

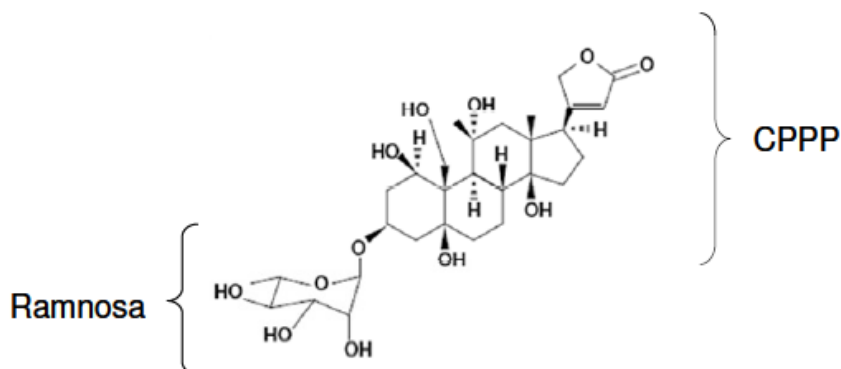


Figura 3. Estructura química de la ouabaína según una proyección de Fischer (D). Los compuestos digitálicos pueden ser clasificados atendiendo a su origen en cardenólidos, presentes en vegetales (p.ej. ouabaína) y bufadeniólidos, originalmente encontrados en la piel de sapo (p. ej. bufalina). Todos ellos comparten una estructura básica esteroidea (ciclopentanoperhidrofenantreno, CPPP) unida a una lactona que puede ser pentacíclica (cardenólidos) o hexacíclica (bufadeniólidos). Además, los esteroides cardiotónicos pueden estar sustituidos por una o varias hexosas. En el caso de la ouabaína, el sustituyente es el monosacárido ramnosa.

Hoy día se han definido las rutas biosintéticas de ouabaína y sustancias análogas en mamíferos y se ha detectado la presencia de digitálicos en cultivos de células adrenocorticales (Laredo y col., 1994; El-Masri y col., 2002), células cromafines y PC12 (Koniyama y col., 2001). Si bien las concentraciones plasmáticas de ouabaína en situación de

INTRODUCCIÓN

reposo rondan el picomolar, en ciertos tejidos cercanos a los lugares de producción endógena se alcanzan concentraciones nanomolares de ouabaína. En la glándula adrenal, esta concentración es unas 500 veces superior a la concentración en plasma (Kölbel y Schreiber, 1996). La hormona adrenocorticotropina, la angiotensina II, la vasopresina y la fenilefrina también estimulan la liberación de ouabaína desde la corteza adrenal *in vitro* (Laredo y col., 1997, Shah y col., 1999). Así pues, la ouabaína cumple los requisitos para ser considerada un neuroesteroide de producción endógena con funciones de hormona a nivel sistémico. Además se libera fisiológicamente en respuesta al ejercicio físico donde sus acciones inotrópicas cardíacas y presoras son de utilidad. Tras someterse a ejercicio intenso o hipoxia, se han detectado concentraciones de ouabaína plasmáticas en torno a los 200 nM, que son similares a los de otras hormonas esteroideas (Nicholls y col., 2009; Bauer y col., 2005). En estos casos su concentración en suero también aumenta del orden de 50 a 500 veces (De Angelis y col., 1998; Antolovic y col., 2000). Este aumento actúa sobre la actividad simpática, el miocardio, el músculo liso arterial y el endotelio arterial. La Na^+/K^+ ATPasa, al ser bloqueada parcialmente por la ouabaína (Blaustein y col., 1993; Xie y col., 2002) aumenta la concentración de Na^+ intracelular $[\text{Na}^+]_i$, e inicia una cadena de eventos celulares iónicos y enzimáticos. Al aumentar la concentración de $[\text{Na}^+]_i$, el Ca^{2+} intercambiado por Na^+ es secuestrado inmediatamente por el RE, lo que incrementa de manera significativa la concentración del Ca^{2+} intra-reticular (Skou y

INTRODUCCIÓN

col.,1957; Blaustein y col., 1993) sin aumentar la concentración del $[Ca^{2+}]_c$. El intercambio se hace con la relación de 3 Na^+ por Ca^{2+} (Blaustein y col., 1993). Este mecanismo activa el bombeo de Ca^{2+} al interior de la célula miocárdica, el músculo liso arterial, y las células arteriales endoteliales. Durante la contracción miocárdica y del músculo liso arterial el efecto inotrópico aumenta en proporción al calcio liberado por el RE (Xiao y col., 2002) y en las células arteriales endoteliales incrementa la secreción de óxido nítrico (Pacheco y col., 2000) o de endotelina (Saunders y col., 2004). Por otro sistema que todavía no se comprende bien, estas elevaciones del $[Na^+]_i$ actúan sobre los canales de calcio voltaje-dependientes del tipo-L, de voltaje bajo del tipo-T y de los canales de calcio activados por descarga de Ca^{2+} (CRAC). Además generan oscilaciones en la $[Ca^{2+}]_c$ (Aizman y col., 2001), las cuales, de acuerdo con su frecuencia, amplitud y duración controlan todas las funciones celulares, desde la fertilización del huevo hasta la muerte celular o apoptosis (Berridge y col., 1997; Xiao y col., 2002).

La digoxina y la ouabaína se utilizan en la medicina occidental para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y ciertos tipos de arritmias supraventriculares (Rang y Dale, 2008). El estrecho margen/rango terapéutico y su elevada toxicidad han limitado el uso de estas sustancias en terapéutica. Si bien hoy día se siguen usando

preparados comerciales con digoxina, la ouabaína está restringida al uso hospitalario y ha sido desplazada por terapias menos peligrosas.

2.3.1. Efectos orgánicos de la ouabaína

1. Efectos sobre el sistema cardiovascular:

Es un agente inotrópico positivo, es decir aumenta la fuerza del latido cardíaco, a la par que disminuye la frecuencia y la conducción cardíacas. Estos últimos efectos parecen relacionados con una acción parasimpaticomimética sobre el nervio vago y el seno carotídeo. Es también un agente hipertensor que por sí misma aumenta la contractilidad del músculo liso vascular. Se han diseñado antagonistas de la acción de ouabaína que han logrado revertir la hipertensión en modelos animales (Ferrari y col., 2006).

2. Efectos sobre el sistema nervioso central (SNC):

Hasta la fecha, no se ha establecido una función distinta del mantenimiento de la homeostasia iónica para la NKA y los esteroides cardiotónicos en el SNC, aunque algunos estudios los asocian con la aparición de trastornos del ánimo (Goldstein y col., 2006). Ciertas mutaciones en la secuencia de la NKA se han correlacionado con la aparición de migrañas, enfermedad de Parkinson y epilepsia (Aperia, 2007).

INTRODUCCIÓN

Además de su papel estabilizador de la estructura de la NKA, indispensable para su funcionamiento como transportador iónico, la isoforma $\beta 2$ se ha identificado como la proteína AMOG (Adhesión Molecule On Glia) (Gloor y col., 1990) y podría mediar interacciones entre astrocitos y neuronas.

3. Modulación del sistema inmunológico:

La bomba Na^+/K^+ ATPasa, a través de su función como transductor de señales activada por ouabaína, es capaz de modular la proliferación y actividad de células blancas de la sangre (Rodríguez-Mascarenhas y col., 2009).

4. Efectos sobre el metabolismo:

La ouabaína aumenta la glucogenosíntesis en el músculo estriado, pudiendo actuar en este tejido como un glucocorticoide. La activación de la ruta Src cinasa se ha asociado con este fenómeno (Kotova y col., 2006).

3. La bomba Na^+K^+ ATPasa

Debido a su especial importancia en el estudio que nos planteamos, analizaremos la bomba Na^+/K^+ ATPasa y sus acciones en el

INTRODUCCIÓN

organismo, así como la de sus ligandos naturales, los glucósidos cardiotónicos, entre los que se encuentra la ouabaína.

Es una proteína integral de membrana presente virtualmente en todos los tipos de células. Lleva a cabo el transporte de iones Na^+ y K^+ de forma antiparalela a ambos lados de la membrana, sacando Na^+ a la par que introduce K^+ . Esta actividad se realiza en contra de gradiente y precisa suministro de energía en forma de ATP (**Figura 4**). Esta estructura es en buena medida responsable del mantenimiento del gradiente electroquímico y, por tanto, del potencial de membrana y es de particular importancia en los procesos de re-polarización en células excitables. Se ha calculado que su actividad consume aproximadamente un 30% del gasto energético total en humanos. En células excitables, la generación de potenciales de acción provoca considerables cambios en las concentraciones de Na^+ y K^+ intracelulares, que deben ser restablecidas durante la fase de re-polarización de la membrana. Se ha calculado que en células excitables la bomba puede consumir hasta un 60% de la energía celular para el mantenimiento del gradiente de iones a ambos lados de la membrana. El gradiente electroquímico se utiliza también para el transporte de solutos y nutrientes esenciales para la supervivencia de la célula (ej. co-transportadores Na^+ /glucosa).

El fenómeno del transporte de Na^+ y K^+ fue descrito por primera vez por Schatzmann en 1953 en membranas de eritrocitos. Poco más

INTRODUCCIÓN

tarde, Jens Skou caracterizó la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Skou, 1957). Este y sucesivos trabajos le valieron a Skou el premio Nobel de Química en el año 1997. En estos estudios, se revela la dependencia de Mg^{2+} y se estudian los efectos de distintas concentraciones de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} sobre la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa.

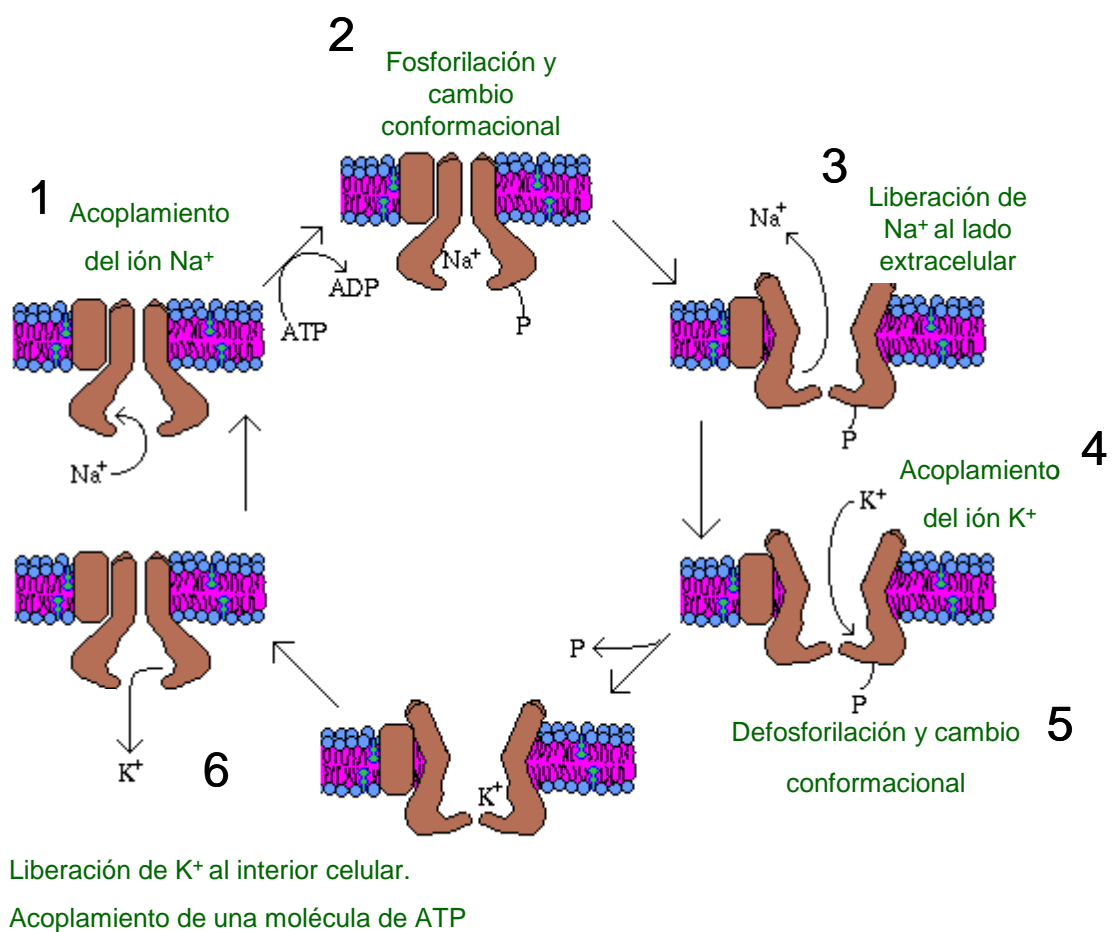


Figura 4. Transporte iónico a través de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. 1- Acoplamiento de tres iones Na^+ intracelulares al lado intracitoplasmático. 2- Fosforilación de la proteína mediante la hidrólisis de ATP y liberación de difosfato de adenosina (ADP). El grupo fosfato, al unirse a la proteína, provoca un cambio conformacional en la bomba que expone los átomos de Na^+ al líquido extracelular. 3- Liberación del Na^+ fuera de la célula. 4- Dos iones K^+ extracelulares se acoplan a la proteína. 5- El grupo fosfato se

INTRODUCCIÓN

libera induciendo el ingreso de los dos átomos de K^+ en la célula. 6- Liberación de K^+ al interior celular y acoplamiento de una nueva molécula de ATP.

Bioquímicamente, la bomba Na^+/K^+ ATPasa se clasifica como una ATPasa tipo P (transportadores activos dependientes de ATP). La proteína es un heterodímero compuesto por dos subunidades llamadas α y β . En la subunidad α residen la actividad catalítica y los dominios de unión a sustratos, ATP y Mg^{2+} . En ella se encuentra también el sitio de unión de los digitálicos. La subunidad β está relacionada con los procesos de maduración y ensamblaje a la membrana plasmática (Blanco y Mercer, 1998; Kawamura y Noguchi, 1991). La expresión de subunidades α y β sigue una estequiometría 1:1, siendo necesaria la expresión de ambas para la formación de una proteína funcional (**Figura 5**). Las distintas isoformas α (α_1 , α_2 y α_3) presentan una distribución tisular diferencial y se han asociado con funciones específicas.

En 1986, Shull y colaboradores lograron identificar la expresión de tres isoformas de la subunidad α en rata (Shull y col., 1986). Las distintas secuencias se obtienen por ajuste alternativo de un mismo gen. La isoforma α_1 es la más abundante y se encuentra presente en virtualmente todas las estirpes celulares. Esta isoforma se relaciona con el mantenimiento de los gradientes electroquímicos y del potencial de membrana. Su expresión es indispensable para la vida; ratones transgénicos deficientes en esta subunidad mueren al poco del parto (Golovina y col., 2003). La isoforma α_2 es la segunda en importancia

INTRODUCCIÓN

cuantitativa. Se ha encontrado expresada en músculo esquelético y cardíaco, riñón y cerebro. La isoforma $\alpha 3$ sólo se expresa en cerebro y riñón (Martín-Vasallo et al., 1994).

Debido a sus similitudes estructurales, funcionales y farmacológicas, es frecuente encontrar en la literatura el término “subunidad $\alpha 2/ \alpha 3$ ” para referirse indistintamente a cualquiera de esas subunidades. Se ha descrito la existencia de una cuarta isoforma de subunidad α , la $\alpha 4$, presente en testículos de rata (Blanco y col., 1999), si bien de momento son pocos los estudios que aclaran las razones de su presencia en este órgano.

Se conocen tres isoformas de la subunidad β . Sus niveles de expresión presentan una distribución tisular diferenciada y se sugieren para ellas funciones específicas. Cada una de ellas puede teóricamente combinarse con todas las subunidades α (Crambert y col., 2000), sin embargo sólo algunos dímeros concretos se han encontrado expresados en tejidos. En células cromafines de rata se ha demostrado la co-expresión en membrana de dímeros $\alpha 1/ \beta 1$ y $\alpha 2/ \beta 2$ (Lin y col., 2005).

La sensibilidad a glucósidos cardiotónicos y la distribución tisular de las isoformas de subunidad α varía mucho entre distintas especies. En roedores (rata y cobayo), la isoforma $\alpha 1$ es resistente a la acción de digitálicos; presenta una K_d tres órdenes de magnitud mayor (orden

INTRODUCCIÓN

milimolar) que sus homólogas α_2/α_3 (orden nanomolar) (O'Brien y col., 1994). Sin embargo en humano, perro y oveja las tres isoformas α son muy sensibles a digitálicos (rango nanomolar).

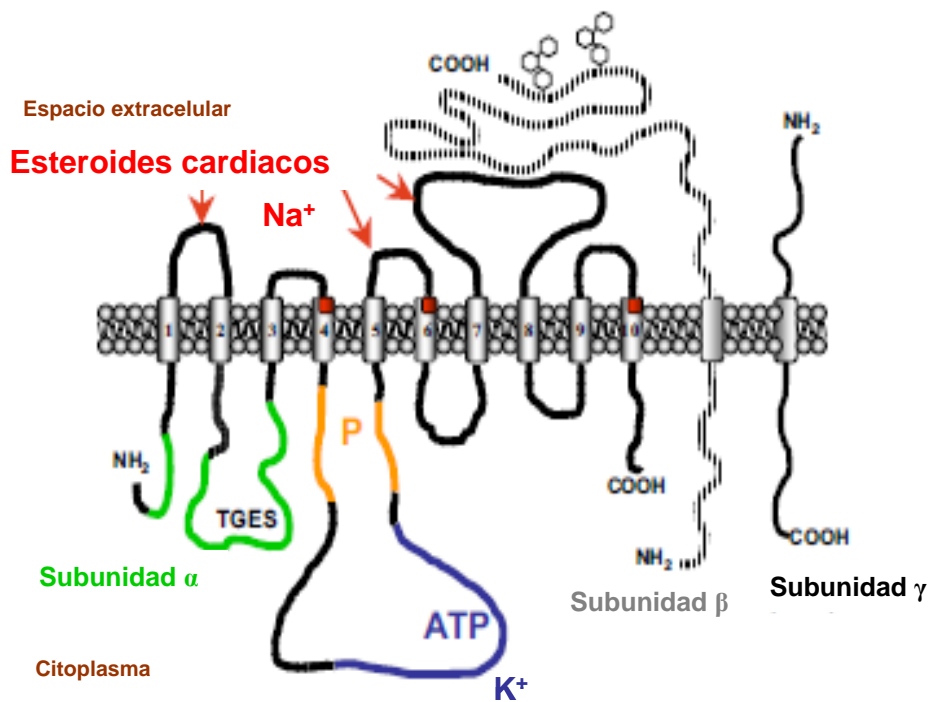


Figura 5. Esquema de la estructura de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. La subunidad α determina la afinidad de la bomba por los distintos esteroides cardiacos.

3.1. Efectos de la ouabaína en la bomba Na^+/K^+ ATPasa

La inhibición del transporte activo Na^+/K^+ mediante la unión a la bomba Na^+/K^+ ATPasa es el principal efecto conocido de los esteroides cardiotónicos. A lo largo de los últimos 50 años, se han establecido

INTRODUCCIÓN

diversos modelos complementarios para justificar los notables efectos de esta familia de fármacos en el músculo cardíaco, así como sus efectos en el mantenimiento de la homeostasia iónica, la tensión arterial y la secreción de neurotransmisores.

1. Hipótesis del enlentecimiento de la bomba de Na^+ :

La hipótesis del enlentecimiento de la bomba de Na^+ ha sido desarrollada desde la década de 1960 en un intento por explicar la acción inotrópica positiva de los digitálicos sobre el músculo cardíaco.

Se explica de la manera siguiente: la unión del glucósido a la bomba inhibe la actividad ATPasa de la bomba impidiendo la salida de Na^+ y la entrada de K^+ a través de la misma. La $[\text{Na}^+]_c$ aumenta progresivamente en la célula y se establece un nuevo equilibrio iónico que permite la reversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que introduce Ca^{2+} para compensar el exceso de Na^+ intracelular. La sobrecarga de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en estas condiciones explica la mayor fuerza de contracción cardíaca y puede generar las arritmias características de la intoxicación digitálica cuando la capacidad de almacenamiento/tamponamiento de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico se ve sobrepasada (Wasserstrom y Aistrup, 2005). La contracción cardíaca también se explica por la mayor salida de Ca^{2+} a través del InsP_3R del RE al citosol (Miyakawa-Naito y col., 2003), en respuesta a una inhibición parcial de la bomba Na^+/K^+ ATPasa que conduce a una mayor entrada de Ca^{2+} en la célula. Del

INTRODUCCIÓN

mismo modo, cuando se produce un aumento del Ca^{2+} en el citosol, más cantidad de este ión tiene que ser tamponada por el RE, que es muy sensible a pequeñas oscilaciones de Ca^{2+} , resultando en un pequeño incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ pero en una gran cantidad de Ca^{2+} contenida en el RE, el cual actúa amplificando la señal de Ca^{2+} cuando la célula lo necesita (Blaustein, 1993).

El modelo de enlentecimiento está apoyado por multitud de trabajos que demuestran la fuerte relación entre las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} intra y extracelulares, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ del plasmalema y el inotropismo cardíaco inducido por digitálicos (Grupp y col., 1985; Abete y Vasalle, 1988; Tanaka y col., 2007; Altamirano y col., 2006).

2. Hipótesis del plasmerosoma:

Existen algunas evidencias que revelan que el lógico modelo iónico del enlentecimiento de la bomba de Na^+ no basta para explicar completamente el efecto inotrópico positivo de los digitálicos. Por ejemplo, se ha observado que la ouabaína es capaz de ejercer su efecto inotrópico sin necesidad de aumentar la $[\text{Na}^+]_c$ (Arnon y col., 2000). Así mismo, eliminar el Na^+ de las soluciones de trabajo no impide que la ouabaína ejerza su acción inotrópica en el músculo cardíaco (Nishio y col., 2004). Además, otras sustancias inhibidoras del transporte Na^+/K^+ no producen los mismos efectos sobre la contractilidad cardíaca

INTRODUCCIÓN

(Potter y col., 2009) ni la secreción de catecolaminas (García y col., 1981).

Estos datos han generado matizaciones de la teoría vigente. El grupo del profesor Blaustein ha desarrollado la teoría del plasmerosoma, según la cual el aumento de $[Na^+]_c$ se produciría en zonas localizadas de la submembrana anejas al intercambiador Na^+/Ca^{2+} . En estas zonas sí se alcanzaría la $[Na^+]_i$ suficiente para revertir el intercambiador e introducir Ca^{2+} a través del mismo. Estudios de patch-clamp en cardiomiocitos de cobayo apoyan esta teoría (Fujioka y col., 1998).

Se ha encontrado una co-localización en zonas específicas de la membrana plasmática entre la bomba Na^+/K^+ , el intercambiador Na^+/Ca^{2+} y el retículo endoplásmico (RE) en astrocitos, neuronas, cardiomiocitos y células cromafines de rata (Juzashova y col., 1997). En concreto, son las isoformas $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la bomba las que co-localizan con estas estructuras, mientras que la $\alpha 1$ está distribuida homogéneamente por toda la membrana. La isoforma $\alpha 2$ se ha asociado con el control de la señal intracelular del Ca^{2+} (Golovina y col., 2003) y, además, parece modular la actividad del intercambiador (Swift y col., 2008).

La proximidad de ciertas regiones del retículo sarco/endoplásmico con el intercambiador (Blaustein y col., 2002) permite explicar con mayor facilidad que se alteren los procesos de

INTRODUCCIÓN

entrada y salida de Ca^{2+} en esta organela, que a su vez son sensibles a cambios en las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} (Sorimachi y col., 1992; Thrower y col., 1998). En cardiomiocitos, se ha observado que la ouabaína incrementa la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (Nishio y col., 2002; Milla y col., 2011).

3. Generación de oscilaciones de Ca^{2+} dependientes del RE:

Utilizando células procedentes del túbulo proximal de distintas especies, se ha demostrado que la bomba Na^+/K^+ es capaz, en presencia de ouabaína, de provocar la apertura directa de receptores de InsP_3 de RE y generar salida de Ca^{2+} en forma de oscilaciones (Aizmann y col., 2001; Miyakawa-Naito y col., 2003). La unión directa del dominio N-terminal de la bomba Na^+/K^+ ATPasa con el InsP_3R es suficiente para generar esta señal sin necesidad de elevar la concentración de InsP_3 (Yuan y col., 2005; Wang y col., 2006). Este fenómeno se ha observado también en astrocitos de hipocampo de rata (Liu y col., 2007).

Los glucósidos cardiotónicos son también capaces de aumentar la probabilidad de apertura de los RyR de cardiomiocitos de forma dependiente de Ca^{2+} (Rardon y Wasserstrom, 1990).

4. Regulación génica y activación de cascadas de señalización intracelular por glucósidos cardiotónicos:

INTRODUCCIÓN

Además de sus efectos sobre las concentraciones iónicas en la célula, los glucósidos cardiotónicos son capaces de activar rutas de señalización intracelular y modificar la expresión de ciertos genes relacionados con procesos de crecimiento, remodelado cardiovascular, apoptosis y protección celular. Por ejemplo, se ha encontrado que la ouabaína es capaz de modificar la expresión de los genes c-fos y c-jun, NFkB, n-Bcl2 y caspasas entre otros. La regulación de la expresión génica por ouabaína está al menos en parte regulada por Ca^{2+} y parece estar mediada en algunos casos por canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCVD) tipo L (Peng y col., 1996; Aizmann y col, 2001).

La ouabaína es capaz de activar el receptor del factor de crecimiento de la epidermis (EGFR) y a través de él, activar la proteína ERK1/2 y la cascada de las MAP cinasas (Plourde y col., 2006). Este proceso es dependiente de proteína cinasa C (Mohammadi y col, 2001).

Otra cinasa activada por ouabaína es la Src-tirosina cinasa, que forma complejos funcionales con la bomba Na^+/K^+ ATPasa en células renales (Tian y col., 2005) y neuronas corticales (Wang y Yu, 2005). La ruta de la PI3K/Akt se ha asociado con la hipertrofia cardíaca inducida por glucósidos cardiotónicos (Liu y col., 2007).

5. Endocitosis de la Na^+/K^+ ATPasa inducida por ouabaína:

INTRODUCCIÓN

Utilizando distintas estirpes de células renales, se ha logrado visualizar la internalización de la subunidad α de la bomba en presencia de concentraciones nanomolares de ouabaína (que no afectan al transporte iónico). Se ha descrito un mecanismo endocitótico dependiente de clatrina y fosfatidil-inositol-3-cinasa (PI3K) que, a través de la formación de endosomas, transporta esta subunidad al núcleo (Liu y col., 2004). La dopamina es otra sustancia capaz de provocar endocitosis de la bomba (Chibalin y col, 1999). El papel funcional de este fenómeno es aún desconocido, pero se piensa que puede tener relación con la activación de Src-cinasas (Liu y col., 2004) y con la modificación de la expresión génica inducida por ouabaína. Recientemente se ha caracterizado la presencia constitutiva de la bomba en regiones subplasmalemales que no se relaciona con la función de bombeo iónico sino con la activación de cascadas intracelulares (Liang y col., 2007). Posiblemente exista un recambio de la bomba Na^+/K^+ ATPasa que modula la cantidad de bomba en la membrana para hacer frente a distintas situaciones fisiológicas.

6. Otros receptores para ouabaína:

Se han descrito sitios de unión a ouabaína intracelulares en la membrana del retículo sarcoplásmico de cardiomiocitos de gato que parecen jugar un papel en el acoplamiento excitación-contracción del músculo cardíaco (Fujino y Fujino, 2005).

4. Tipos de muerte celular

4.1. Necrosis y apoptosis

En el organismo son habituales dos formas de muerte celular, necrosis y apoptosis. Ambas pueden suceder de forma independiente, secuencial o simultánea (Hirsch, 1997; Zeiss, 2003). Las características morfológicas de ambas permiten, en la mayoría de los tejidos, establecer claras diferencias.

La necrosis es una forma patogénica de muerte celular que resulta de una lesión accidental. El proceso es violento y catastrófico, debido a que se desarrolla un fenómeno de degeneración en el entorno celular como consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura, con alteración definitiva de la función normal en un daño de carácter irreversible. Es un proceso pasivo desde el punto de vista energético caracterizado por el agotamiento de los recursos energéticos, pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana celular al comienzo, la entrada a favor de gradiente electroquímico de iones extracelulares y de agua y el aumento del volumen citoplasmático lo que conduce a la lisis celular, la cual causa inflamación del medio adyacente debido a la liberación del contenido citosólico al medio extracelular (Kerr y col., 1972; Majno y Joris, 1995; Trump y col., 1997). Este daño está desencadenado por lesiones de tipo

INTRODUCCIÓN

mecánico o químico, durante un daño por isquemia, exposición a temperaturas extremas, traumatismos etc.

El término “apoptosis” (*a-po-toe-sis*) surgió en 1972 (Kerr y col., 1972; Kerr, Kerr, Wyllie y Currie, 1972; Paweletz, 2001; Kerr 2002) al describir las características morfológicas de ciertas células que morían espontáneamente durante el desarrollo. Posteriormente se demostró que tanto las células normales como las patológicas activaban un programa de muerte celular intrínseco en determinadas circunstancias, de modo que estas células morían de forma controlada y eran eliminadas por macrófagos tisulares antes de que éstas pudieran dañar a otras células o iniciaran reacciones inflamatorias.

La aceptación de que las células poseían un programa de muerte celular intrínseco no fue hasta 20 años después con la identificación de genes implicados en la apoptosis (*ced-3*, *ced-4*, *ced-9*) en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Ellis y col., 1991). Posteriormente se detectaron sus homólogos en humanos (Schwartz y Osborne, 1994), cosa que supuso un avance en el estudio de la apoptosis.

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada es un proceso fisiológico de muerte celular crítico para el normal desarrollo de los organismos multicelulares. Se caracteriza por la conservación de la integridad de la membrana plasmática, evitando la liberación al medio extracelular del contenido celular y el consiguiente

INTRODUCCIÓN

proceso inflamatorio. La apoptosis requiere la expresión de genes específicos, y la síntesis de proteínas, principalmente proteínas de señalización intracelular y de membrana como las caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2 (Evan y Littlewood, 1998; Ashkenazi y Dixit, 1998). Desregulaciones en este proceso pueden contribuir al desarrollo de una gran cantidad de patologías incluyendo el VIH (Li y col., 1995), cáncer (Kerr y col., 1994; King y Cidlowski, 1998; Smyth y col., 2001), enfermedades autoinmunes (Worth y col., 2006), trastornos degenerativos (Ethell y Buhler, 2003), trastornos isquémicos (Hochhauser y col., 2003). La señalización para desencadenar el mecanismo apoptótico puede ocurrir por múltiples mecanismos independientes que pueden iniciarse en el interior o exterior de la célula. Todos los mecanismos de señalización apoptóticos emplean una maquinaria común de destrucción celular que se activa mediante una familia de cisteína proteasas (caspasas) que lisan proteínas en los residuos de aspartato. La eliminación de las células dañadas va acompañada de la degradación del ADN y su fagocitosis por las células vecinas (Strasser y col., 2000).

En la apoptosis el proceso afecta a determinadas células, no necesariamente contiguas, y no a todas en un área tisular. Las células apoptóticas muestran características morfológicas típicas como la presencia de evaginaciones en la membrana plasmática, que a medida que avanza el proceso apoptótico se escindirán formando los

INTRODUCCIÓN

llamados "cuerpos apoptóticos", que contienen material nuclear, mitocondrias, ribosomas y otros restos celulares. La membrana celular no se destruye, lo que impide el escape al espacio extracelular de su contenido resultando un proceso "silencioso" sin inflamación (Savill y Fadok, 2000; Kurosaka y col., 2003). Se produce la retracción del citoplasma y la aparición de vesículas en la membrana, la condensación de la cromatina que pasa a localizarse en la periferia de la membrana nuclear y su degradación en fragmentos de alrededor de 200 pares de bases denominados "oligonucleosomas" (Kerr y col., 1972; Wyllie y col., 1980; Thompson, 1995; Majno y Joris, 1995; Vanus y Stasser, 1996). En el citoplasma se produce granulación fina, con conservación de algunos orgánulos, en especial las mitocondrias que tienen un papel interactivo importante. A nivel nuclear, se degrada el material genético, proceso que se ve reflejado en la condensación de corpúsculos de cromatina. La membrana celular se recoge sobre las eminencias globuliformes, o cuerpos apoptóticos, que forman los elementos deteriorados del citoplasma y núcleo (Kerr y col., 1972, Wyllie y col., 1980). Finalmente, dichos cuerpos son captados por células fagocíticas, las cuales detectan en la superficie de la membrana celular moléculas de fosfatidil serina que han sido traslocadas, ya que normalmente se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática.

INTRODUCCIÓN

En la **figura 6** se representan las principales características de los dos procesos de muerte celular, necrosis y apoptosis, descritos en este apartado.

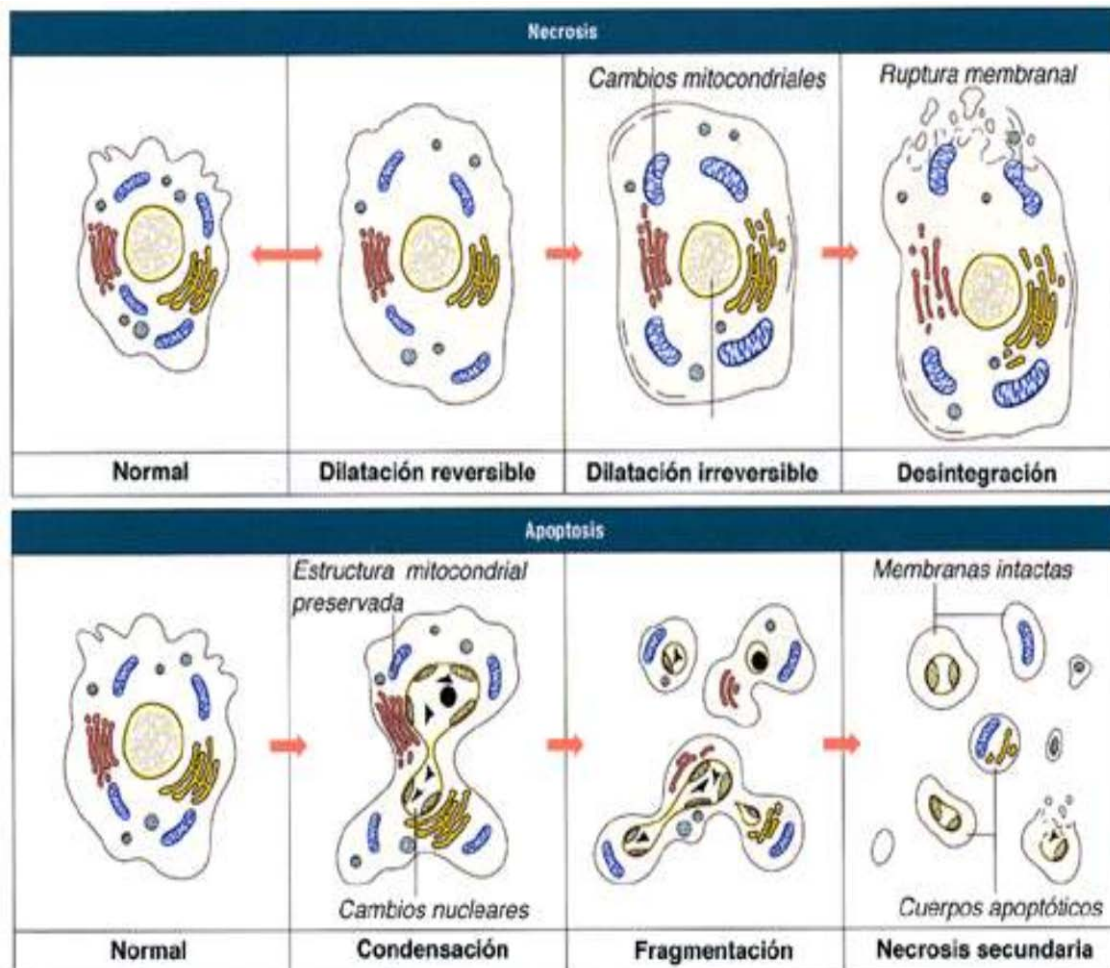


Figura 6. Características de la necrosis y de la apoptosis celular.

4.2. El proceso apoptótico

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. En el ciclo celular hay cuatro fases: mitosis (M), fase de control celular G1, síntesis de ADN (S) y fase de control G2. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN y en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis.

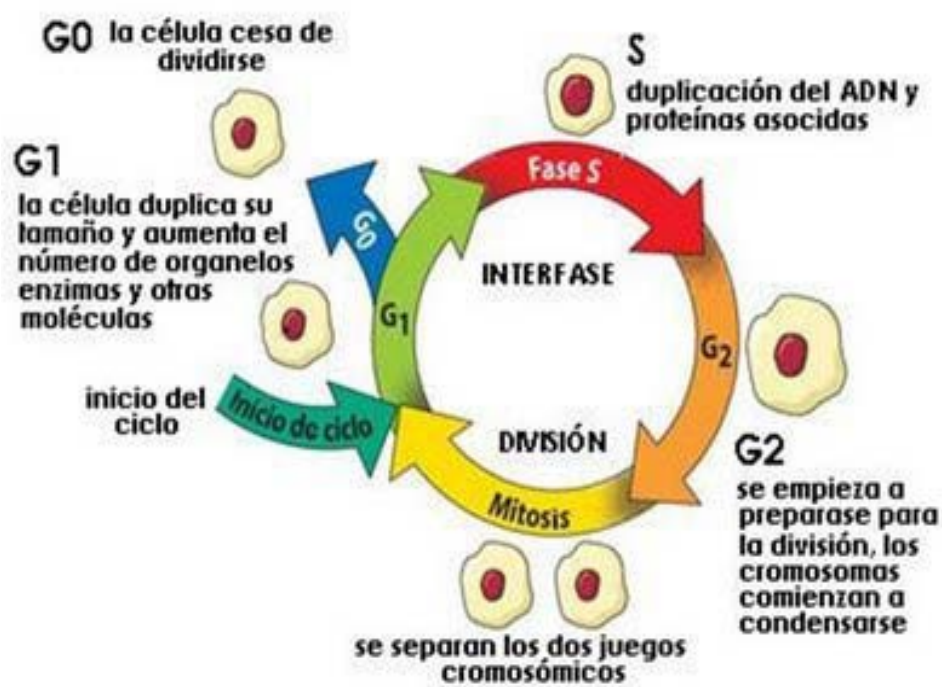


Figura 7. Esquema del ciclo celular.

INTRODUCCIÓN

Durante las primeras fases de la apoptosis, no se producen cambios visibles en las mitocondrias, el RE o el aparato de Golgi (Kerr y col., 1972, Wyllie y col., 1980). Numerosos autores han documentado la destrucción de la membrana mitocondrial externa (Vander Heiden y col., 1997) y la salida del citocromo c (Kluck y col., 1997, Yang y col. 1997; Cai y col., 1998; Garrido y col., 2005), así como otras proteínas pro-apoptóticas (Salens y col., 2004), y Apaf-1 (Susin y col., 1999). Además se produce la rotura del ADN internucleosomal (Wyllie y col., 1980) y la redistribución de los residuos de fosfatidil serina (Bratton y col., 1997; Fadok y col., 1998).

4.2.1. La maquinaria apoptótica: Las caspasas

La mayoría de los cambios morfológicos que observaron Kerr et al (Kerr, 1972) se deben a un grupo de cisteína proteasas que se activan específicamente en las células apoptóticas. Estas proteasas son homólogas entre si y forman parte de un gran familia de proteínas denominadas "caspasas" (Alnemri, 1996). Se denominan caspasas pues son cisteín proteasas específicas de ácido aspártico. Las caspasas están altamente conservadas en la evolución y pueden ser encontradas desde humanos, pasando por insectos y nematodos hasta la Hidra (Budihardjo y col., 1999).

INTRODUCCIÓN

El primer miembro identificado fue la enzima convertidora de interleukina-1 b (ICE, caspasa-1) responsable de la maduración de la pro-interleukina 1b a su forma pro-inflamatoria y biológicamente activa (Cerretti y col., 1992; Thornberry y col., 1992), aunque no tiene un papel obvio en la muerte celular.

La familia génica de las caspasas contiene 14 miembros en mamíferos de los que se conocen 11 enzimas humanas.

Las caspasas contienen tres dominios: un prodominio N-terminal, un centro activo con cisteína, y una subunidad pequeña C-terminal. Son unas de las proteasas más específicas con un requerimiento inusual y absoluto de cortar después de un residuo de ácido aspártico (Asp) (Stennicke, 1998).

Son sintetizadas como zimógenos enzimáticamente inertes que deben ser cortados proteolíticamente para ser activos. En todos los casos estudiados, la enzima madura es un heterotetrámero que contiene dos heterodímeros y dos centros activos. Existen tres mecanismos generales de activación de caspasas:

a) Activación por otra caspasa (autocatalítica):

Como su nombre indica, las caspasas son proteasas que cortan después de un residuo de ácido aspártico. Efectivamente, un modo simple de activar una procaspasa es exponerla a otra previamente

INTRODUCCIÓN

activada. Esta estrategia de activación denominada “cascada de caspasas” es muy utilizada por las caspasa-3, -6 y -7. Estas tres caspasas se denominan “caspasas efectoras” (Slee y col., 2001) y son más abundantes y activas que sus hermanas.

La cascada de caspasas es un método útil para amplificar e integrar las señales pro-apoptóticas, pero no pueden explicar cómo se activó la primera caspasa. Existen al menos dos aproximaciones que explican dicha activación.

b) Activación inducida por proximidad:

La caspasa-8 es la “caspasa iniciadora” clave en la vía de los receptores de muerte. Después de la unión del ligando, forman un complejo de señalización de membrana que reclutan, a través de sus proteínas adaptadoras, varias moléculas de procaspasa-8. con lo que se aumenta la concentración local de zimógeno. Así se cortan mutuamente y se activan unas a otras.

c) Asociación con una subunidad reguladora:

El mecanismo de activación más complejo es el utilizado por la caspasa-9. El requerimiento clave para la activación de la caspasa-9 es su asociación con Apaf-1 y con el citocromo c, en un proceso ATP dependiente, formando el “apoptosoma” (Chinnaiyan, 1999; Hill y col.,

INTRODUCCIÓN

2004). La activación de la caspasa-9 es debida a un cambio conformacional, no a proteolisis.

En resumen, las caspasas efectoras (-3, -6 y -7) se activan proteolíticamente por otras caspasas mientras que las caspasas iniciadoras (-8 y -9) son activadas por interacciones reguladas proteína-proteína.

La caspasa más prevalente en la célula es la caspasa-3 que es la última responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos, junto con las caspasas -6 y -7. Interviene, por ejemplo, en la fragmentación del ADN (Enari y col., 1998; Liu y col., 1997; Sakahira y col., 1998); en la formación de vesículas en la membrana plasmática (Martin y col., 1995; Kothakota y col., 1997; Lee y col., 1997); y en la externalización de la fosfatidilserina (Martin y col., 1996; Fadok y col., 2001).

Las células también contienen inhibidores naturales de las caspasas (van Loo y col., 2002; Schimmer y col., 2004) conocidas como "proteínas inhibidoras de la apoptosis" (*Inhibitors of apoptosis proteins*, IAPs). Todos ellos han demostrado una actividad anti-apoptótica *in vitro* (Roy y col., 1997; Deveraux y col., 1997, 1998; Ambrosini y col., 1997) frente a ligandos y transductores de la familia de receptores del "factor de necrosis tumoral" (*Tumor necrosis factor*, TNF), miembros pro-apoptóticos de la familia de Bcl-2, el citocromo c y agentes quimioterápicos (Deveraux y col., 1999). Además son inhibidores directos

INTRODUCCIÓN

de las caspasas -3 y -7 activas y también de la procaspasa-9, pero no de las caspasas-1, -6, -8 ni -10.

La unión y la inhibición de las caspasas por las IAPs es mediada por dominios repetidos (BIR, Ring, CARD) dentro de las IAPs que pueden promover su degradación (Yang y col., 2000) y, presumiblemente, cualquier caspasa unida ella. De esta manera, las IAPs frenan la apoptosis uniéndose, inhibiendo y quizá degradando caspasas.

Existen dos tipos generales de vías de señalización que permiten el inicio de la activación de caspasas iniciadoras de la muerte celular programada. La primera de ellas depende de la participación de la mitocondria, y se conoce como “vía intrínseca”, y la segunda implica a los receptores de muerte como son el receptor 1 de TNF (TNFR-1) y Fas (CD95), y es conocida como “vía extrínseca”.

4.2.1.1. Vía intrínseca o mitocondrial

La mitocondria es la productora de energía para la célula, pero también recluta proteínas pro-apoptóticas. La más prominente entre ellas es el citocromo c, el humilde transportador de electrones. Varios trabajos han revelado que el citocromo c es todo lo contrario a inocuo y que además de su implicación en la fosforilación oxidativa mitocondrial, es uno de los componentes requeridos para la activación

INTRODUCCIÓN

de la caspasa-9 en el citosol (Li y col., 1997; Cai y col., 1998; Du y col., 2000; Loo y col., 2002; Garrido y col., 2005).

No se conoce exactamente cómo el citocromo c atraviesa la membrana externa, pero está claro que las proteínas de la familia Bcl-2 esta íntimamente implicada en la regulación de este proceso (Cori y Adams 2002). El nombre de la familia se debe al primer miembro, que fue aislado como un gen implicado en el linfoma de células B (de ahí el nombre *bcl*, "*B-cell lymphoma*") que es homólogo del represor de la apoptosis *ced-9* de *C. elegans*. Esta familia consta de 19 miembros que se ha clasificado en tres grupos basándose en similitudes estructurales y funcionales. Cada miembro posee al menos uno de los cuatro motivos conservados denominados "dominios de homología con Bcl-2" ("*Bcl-2 homology domains*", BH): BH1-BH4. Los miembros del grupo I, como Bcl-2 y Bcl-X L, poseen actividad anti-apoptótica y se caracterizan por tener los cuatro dominios BH (BH1-BH4). Además poseen una cola hidrofóbica en el C-terminal que localiza la proteína en la membrana externa de la mitocondria. El grupo II consta de miembros de la familia de Bcl-2 con actividad pro-apoptótica, como por ejemplo Bax y Bak. Tienen estructura similar a las del grupo I pero carecen del dominio BH4. Estudios de estructura y función sugieren que la actividad anti y pro-apoptótica está determinada por una región relativamente larga que incluye dos hélices a que participan en la inserción a la membrana. Los miembros del grupo III también tienen actividad pro-apoptótica. Todos

ellos se caracterizan por la presencia de un único dominio BH3, además pueden o no tener región transmembrana. Los miembros más característicos son Bid, Bad, Bim, Bik.

4.2.1.2. Vía extrínseca o de los receptores de muerte

La vía extrínseca o de los receptores de muerte implica a receptores transmembrana miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) (Locksley y col., 2001) y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF ("*TNF-related apoptosis-inducing ligand*", TRAIL)/Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Los receptores de muerte poseen un dominio intracelular en el C-terminal del receptor denominado "dominio de muerte" ("death domain", DD) (Ashkenazi y Dixit, 1998). Cuando un ligando se une a estos receptores se puede producir la muerte por apoptosis de la célula (Chicheportriche y col., 1997; Ashkenazi y Dixit, 1998; Peter y Kramer, 1998; Suliman y col., 2001; Rubio-Moscardo y col., 2005).

El miembro de los receptores de muerte más estudiado y relevante en inmunología es el CD95 o Fas (Chicheportriche y col., 1997; Ashkenazi y Dixit, 1998; Peter y Kramer, 1998; Suliman y col., 2001; Rubio-Moscardo y col., 2005). La trimerización, del CD95 tras la unión de su ligando, FasL, es requerida para la transducción de la señal apoptótica. El CD95 activado se asocia al "complejo de señalización inductor de

INTRODUCCIÓN

muerte" (*"death-inducing signalling complex"*, DISC) y al adaptador FADD (*"Fas-associated death domain"*) que presenta el denominado "dominio efector de muerte" (*"death-effector domain"*, DED), encargado de reclutar en el DISC a la procaspasa-8 (o FLICE) (Hsu y col., 1995; Grimm y col., 1996; Wajant, 2002). Después, la procaspasa-8 es activada proteolíticamente (Kischkel y col., 1995) y la caspasa-8 activa es liberada al citoplasma (Muzio y col., 1996). La caspasa-8 activa rompe varias proteínas de la célula incluyendo la procaspasa-3, que resulta activada y desencadena la muerte celular.

La inhibición de esta ruta es realizada por proteínas que contienen dos DED, así se inhibe el reclutamiento y la activación de la caspasa-8 (Thome y col., 1997; Hu y col., 1997; Bertin y col., 1997; Yeh y col., 2000).

4.2.1.3 Convergencia de las vías

Contamos con evidencias de que ambas vías de muerte celular por apoptosis están unidas y se encuentran en un determinado momento (Igney y Krammer, 2002). A pesar de esto, hay que tener en cuenta que en la mayoría de las condiciones, este solapamiento es mínimo, y las dos vías operan de manera independiente (Gross y col., 1999; Yin y col., 1999).

INTRODUCCIÓN

La vía de los receptores de muerte y la vía mitocondrial convergen a nivel de la activación de la caspasa-3 (Figura 8).

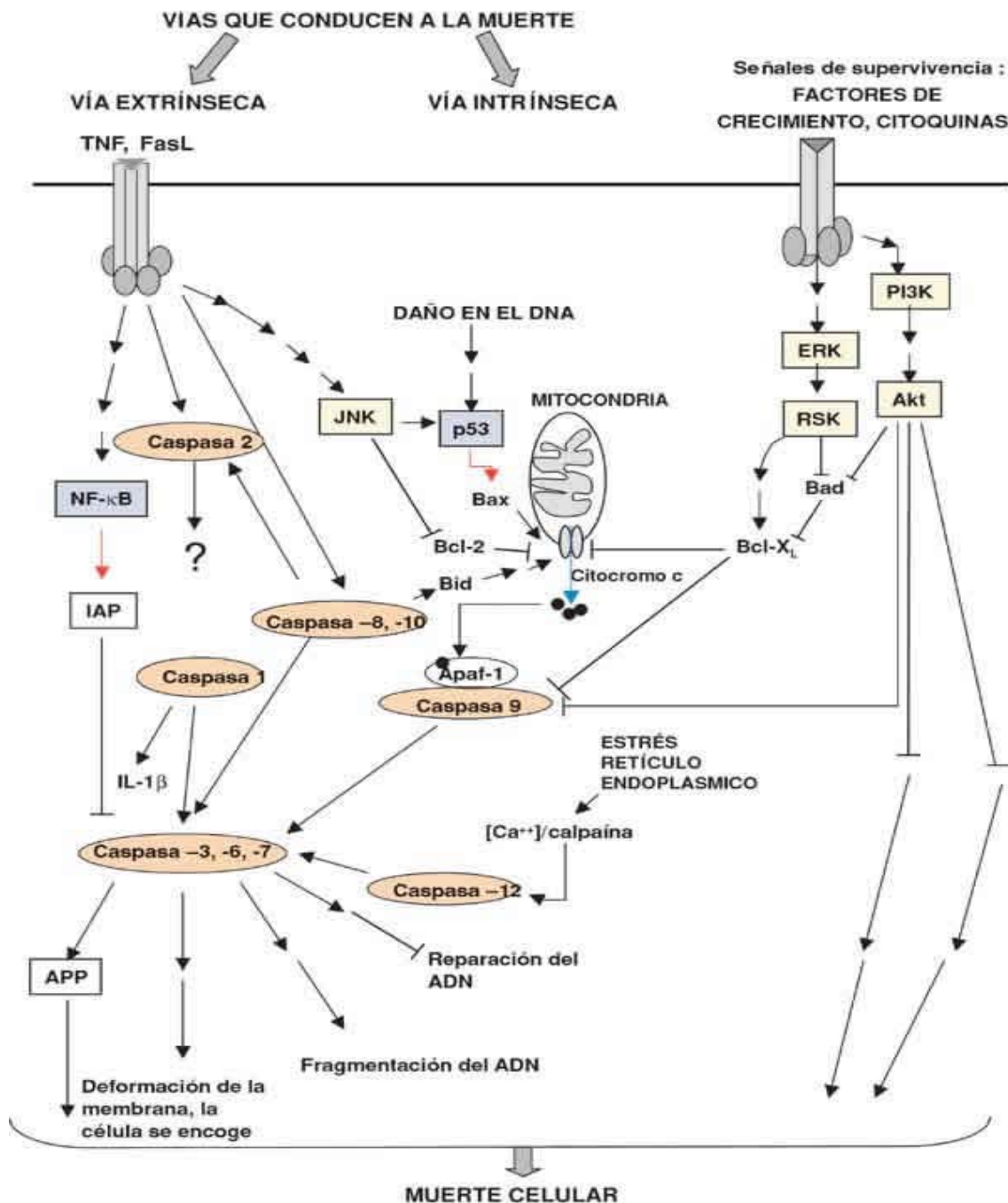


Figura 8. Esquema de la cascada apoptótica y de la activación de caspasas.

INTRODUCCIÓN

El solapamiento y la integración de las dos vías se debe a Bid, un miembro pro-apoptótico de la familia de Bcl-2. La caspasa-8 media la ruptura de Bid incrementando enormemente su actividad pro-apoptótica que resulta en su translocación a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c y de la procaspasa-9. Mediante esta ruta de inducción de apoptosis se activa la caspasa-8 que activa otras caspasas que darán, en última instancia, el fenotipo apoptótico que nosotros detectamos mediante diferentes metodologías.

4.3. El papel de la mitocondria en la apoptosis

La mitocondria tiene un importante papel dentro de la célula, ya que es el orgánulo responsable del metabolismo energético suministrando la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular. Actúan, por lo tanto, como centrales energéticas de la célula sintetizando ATP a expensas de glucosa, ácidos grasos y aminoácidos. Además, participa en los procesos de muerte celular.

4.3.1. Introducción histórica

Probablemente las primeras observaciones se deben al botánico suizo Kolliker quien en 1880-1888 anotó la presencia de unos gránulos con membrana en células musculares de insectos a los que denominó

INTRODUCCIÓN

"sarcosomas". En 1882 el alemán Walther Flemming descubrió una serie de inclusiones a las que denominó "fila". En 1884 también fueron observados por Richard Altmann quien más tarde en su obra publicada en Leipzig "*Die Elementarorganismen*" describe una serie de corpúsculos que observa mediante una tinción especial que incluye fucsina. Especula que se trata de un parásito independiente, con su propio metabolismo y los denomina "bioblastos". El hallazgo fue rechazado por considerarlo un artefacto de la preparación. Los "plastídulos" del protozoólogo italiano Leopoldo Maggi podrían tratarse también de observaciones tempranas de estas organelas.

El nombre de "mitocondria" se debe a Carl Benda quien en 1889 denominó así a unos gránulos que aparecían con gran brillo en tinciones de cristal violeta y alizarina y que anteriormente habían sido denominados "citomicrosomas" por Velette St. George. En 1904 F. Meves confirma su presencia en una planta, concretamente en células del tapete de la antera de *Nimphaea*, y en 1913 Otto Heinrich Warburg descubre la asociación con enzimas de la cadena respiratoria aunque previamente, en 1912, Kingsbury había relacionado estos orgánulos con la respiración celular. En 1934 fueron aisladas por primera vez a partir de homogenizados de hígado y en 1948 Hogeboom, Schneider y Palade establecen definitivamente la mitocondria como el lugar donde se produce la respiración celular. Margit M. K. Nass y Sylvan Nass en 1963 descubren que contienen ADN mitocondrial (Nass y Nass, 1963).

4.3.2. Estructura y composición

La morfología de la mitocondria es difícil de describir puesto que son estructuras muy plásticas que se deforman, se dividen y fusionan. Normalmente se las representa en forma alargada. Su tamaño oscila entre 0,5 y 1 μm de diámetro y hasta 7 μm de longitud. Su número depende de las necesidades energéticas de la célula. Al conjunto de las mitocondrias de la célula se le denomina "condrioma celular".

Las mitocondrias están rodeadas de dos membranas claramente diferentes en sus funciones y actividades enzimáticas, que separan tres espacios: el citosol, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (**Figura 9**). Su estructura se compone de:

a) Membrana externa:

Es una bicapa lipídica exterior permeable a iones, metabolitos y a muchos polipéptidos con poros llamadas "porinas" o VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje), que permiten el paso de grandes moléculas

b) Membrana interna:

Carece de poros y es altamente selectiva. Está implicada en la translocación de moléculas y es aquí donde están las "crestas mitocondriales". En ella residen:

INTRODUCCIÓN

- La cadena de transporte de electrones compuesta por cuatro complejos enzimáticos fijos (complejos I y II) y dos transportadores de electrones móviles (complejos III y IV).
- Un complejo enzimático, el canal de H^+ ATP sintasa que cataliza la síntesis de ATP (fosforilación oxidativa).
- Proteínas transportadoras que permiten el paso de iones y moléculas como el ATP a su través.

Entre ambas membranas queda delimitado un espacio intermembranoso bañado en un líquido similar al hialoplasma rico en protones y cinasas.

c) Matriz mitocondrial:

La matriz mitocondrial o “mitosol” contiene iones, metabolitos a oxidar, ADN circular bicatenario, mitorribosomas ARN mitocondrial. En la matriz tienen lugar diversas rutas metabólicas clave para la vida, como el ciclo de Krebs y la beta-oxidación de los ácidos grasos; también se oxidan los aminoácidos y se localizan algunas reacciones de la síntesis de urea y grupo hemo.

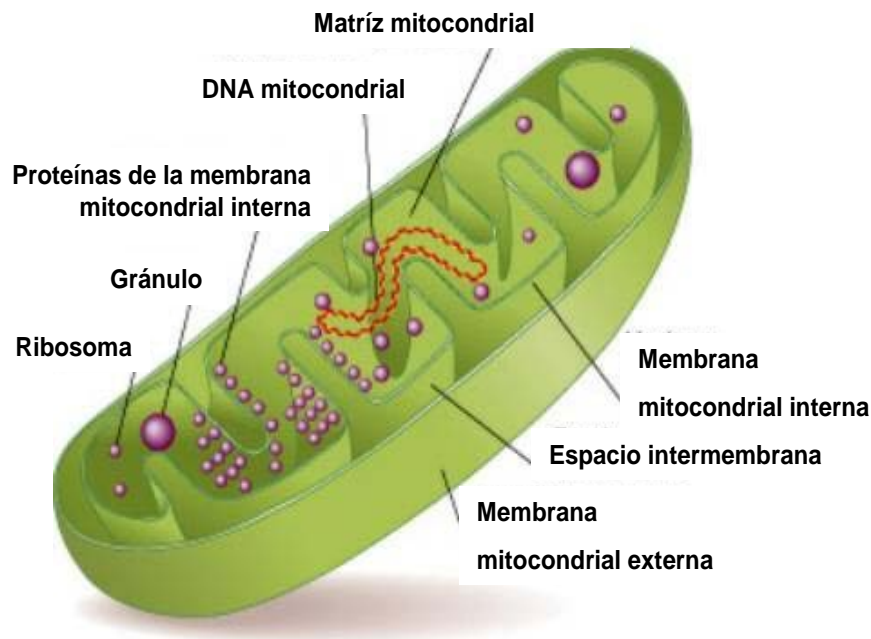


Figura 9. Esquema de la estructura mitocondrial.

4.3.3. Función de la mitocondria

La principal función de las mitocondrias es la oxidación de metabolitos (ciclo de Krebs y beta-oxidación de ácidos grasos) y la obtención de ATP mediante la fosforilación oxidativa, que es dependiente de la cadena transportadora de electrones. El ATP producido en la mitocondria supone un porcentaje muy alto del ATP sintetizado por la célula. También sirve de almacén de sustancias como iones, agua y algunas partículas como restos de virus y proteínas.

La mitocondria participa en la homeostasia celular del Ca^{2+} gracias a la capacidad de acumular este ión en su interior. La

INTRODUCCIÓN

mitocondria cuenta con tres sistemas de transporte de Ca^{2+} que controlan la entrada o la salida de este ión. El uniportador de Ca^{2+} , que internaliza Ca^{2+} a favor de su potencial electroquímico y presenta baja afinidad por el Ca^{2+} , y los intercambiadores $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ y $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$, que sacan Ca^{2+} de la mitocondria (Bernardi, 1999, Tornero y col., 2002). El Ca^{2+} en la mitocondria participa en la regulación de la respiración celular y en la síntesis de ATP (Mattson y col., 2000).

La mitocondria es un orgánulo con un papel importante en la formación de especies reactivas de oxígeno y en las señales de Ca^{2+} citosólico (Rizzuto y col., 1993). En condiciones de isquemia o de excitotoxicidad, el uniportador de Ca^{2+} se mantiene activo debido a su baja afinidad, permitiendo la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, mientras que los intercambiadores se saturan. El exceso de Ca^{2+} que se acumula en la mitocondria desencadena su despolarización, desacoplándose la cadena transportadora de electrones y paralizándose la síntesis de ATP (Bernardi y col., 1994). La caída de los niveles de ATP impide el funcionamiento de las ATPasas que mantienen la homeostasia del Ca^{2+} , lo que contribuye al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y a la activación de diferentes enzimas (fosfolipasas, óxido nítrico sintasa) que participan en la síntesis de radicales libres (Coyle y Puttfarcken, 1993). El estrés oxidativo también contribuye a este círculo vicioso, incrementando la entrada de Ca^{2+} y su liberación desde depósitos intracelulares e inhibiendo proteínas implicadas en la homeostasia del

INTRODUCCIÓN

Ca^{2+} como la SERCA (Pernollet y col., 1996; Viner y col., 1996). Por todo ello, la mitocondria aparece como un nexo de unión entre la elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y la toxicidad celular.

Las alteraciones en la homeostasia de Ca^{2+} son importantes en la apoptosis celular, tanto en los primeros estadios como en la apoptosis tardía. Cuando se incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la mitocondria ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$) se abre el poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) y se produce el consiguiente colapso del potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Schinder y col., 1996; Tornero y col., 2000). Esto acarrea la liberación al citoplasma de factores apoptogénicos (Saelens y col., 2004; Cai y col., 1998; Du y col., 2000; Loo y col., 2002; Garrido y col., 2005) como el citocromo c (Zoratti y Szabo, 1995; Bernardi y Petronilli, 1996), el factor inductor de apoptosis AIF ("*Apoptosis-Inducing Factor*") (van Loo y col., 2002, Schimmer, 2004), la procaspasa-9 o Smac/DIABLO (Zhou y col., 1998; Bernardi, 1999) y la activación de cascadas apoptóticas que concluyen con la muerte de la célula.

El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que se produce en procesos patológicos, puede tamponarse por la mitocondria y proteger así a la célula de una sobrecarga de Ca^{2+} . Sin embargo, este sistema de secuestro de Ca^{2+} también puede alterarse en una situación de estrés celular, por lo que se reduce su capacidad para secuestrar Ca^{2+} . Es entonces cuando se produce el daño celular y la mitocondria se convierte en una fuente de señales de muerte celular.

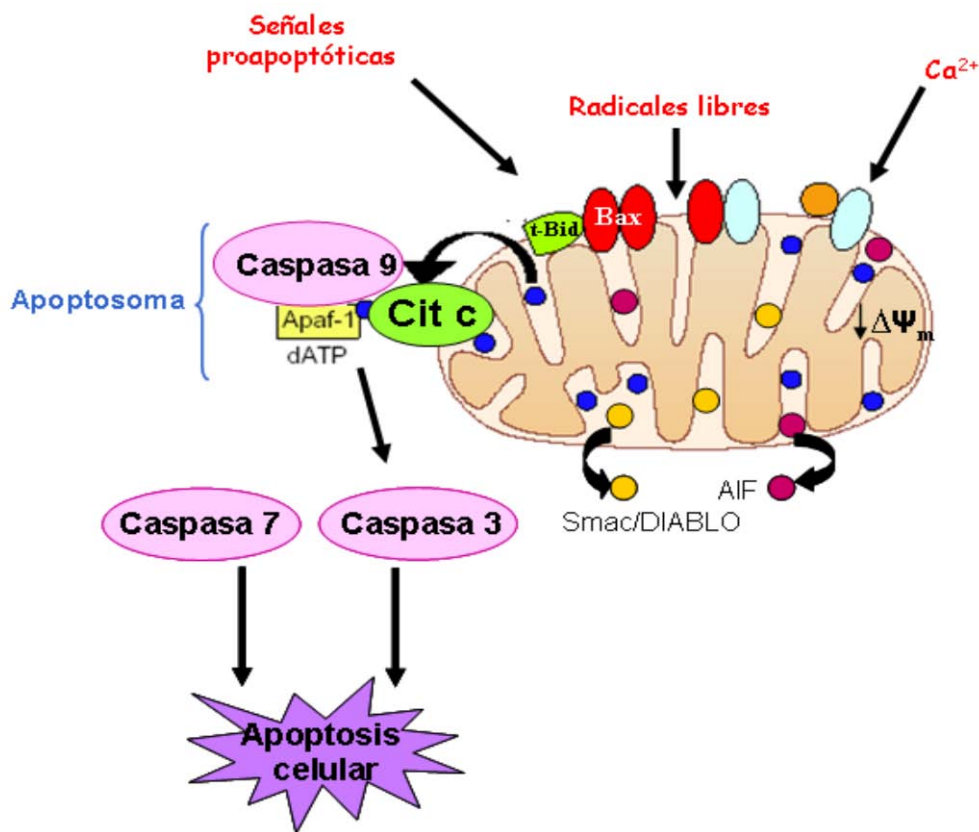


Figura 10. Esquema de la vía de apoptosis celular en la que la mitocondria participa como centro integrador de señales. Cyt c: citocromo c; Apaf-1: factor activador de las proteasas apoptogénicas; AIF: factor inductor de apoptosis; $\Delta\psi_m$: potencial de membrana mitocondrial.

4.3.4. El citocromo c

El citocromo c se encuentra en la membrana mitocondrial interna, está codificado por el ADN nuclear y es sintetizado como un precursor.

Cuando se induce la apoptosis por la vía mitocondrial, se produce la activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2

que producen un poro en la membrana externa mitocondrial a través del cual se liberan numerosas proteínas del espacio intermembrana, entre ellas el citocromo c. Una vez en el citosol, y con gasto de ATP, se une a Apaf-1 para formar el “apoptosoma” que a su vez activa a la caspasa-9 (Chinnaiyan, 1999; Hill y col., 2004). Una vez que la caspasa-9 está activada, ésta activa a las caspasas efectoras, como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis.

4.4. Papel del RE en la apoptosis

4.4.1. Introducción histórica

Anteriormente a la existencia del microscopio electrónico se consideraba que el citoplasma estaba formado por una masa coloidal o hialoplasma, compuesta por agua y proteínas, en ocasiones se encontraban algunos orgánulos como mitocondrias o plastos con la idea de que se encontraban flotando en el hialoplasma. Con la aparición del microscopio electrónico se llegó al descubrimiento de un sistema citoplasmático de membranas, las cuales se encontraban formando un retículo con una zona central de menor densidad, Porter lo llamó “retículo endoplasmático”. Anteriormente era conocido como una estructura filamentosa que se teñía con colorantes básicos. Tras los trabajos de Porter, otros autores mediante cortes finos hechos con ultramicrotomo llegaron a una caracterización más detallada del RE.

4.4.2. Estructura y composición

El RE es una red interconectada de tubos aplanados y sáculos comunicados entre sí, que intervienen en funciones relacionadas con la síntesis protéica, metabolismo de lípidos, y algunos esteroides así como el transporte intracelular. Se encuentra en la célula animal y vegetal, pero no en la procariota. Es un orgánulo encargado de la síntesis y el transporte de las proteínas.

El retículo endoplásmico rugoso (RER) se encuentra unido a la membrana nuclear externa mientras que el retículo endoplásmico liso (REL) es una prolongación del RER.

- El RER, de carácter basófilo, tiene esa apariencia debido a los numerosos ribosomas adheridos a su membrana mediante unas proteínas denominadas "riboforinas". Tiene unos sáculos más redondeados cuyo interior se conoce como "luz del retículo" o "lumen" donde caen las proteínas sintetizadas en él. Está muy desarrollado en las células que por su función, deben realizar una activa labor de síntesis, como las células hepáticas o las células del páncreas.

- El REL, de carácter acidófilo no tiene ribosomas y participa en el metabolismo de lípidos.

El RE tiene variedad de formas: túbulos, vesículas, cisternas. En algunos casos en una misma célula se pueden observar los tres tipos.

INTRODUCCIÓN

Hay diferencias en cuanto a su estabilidad, el liso es más inestable que el rugoso. El liso al poco tiempo de la muerte celular forma unas vesículas, mientras que el rugoso puede permanecer inalterado durante un cierto tiempo; esta mayor estabilidad es debida a los ribosomas.

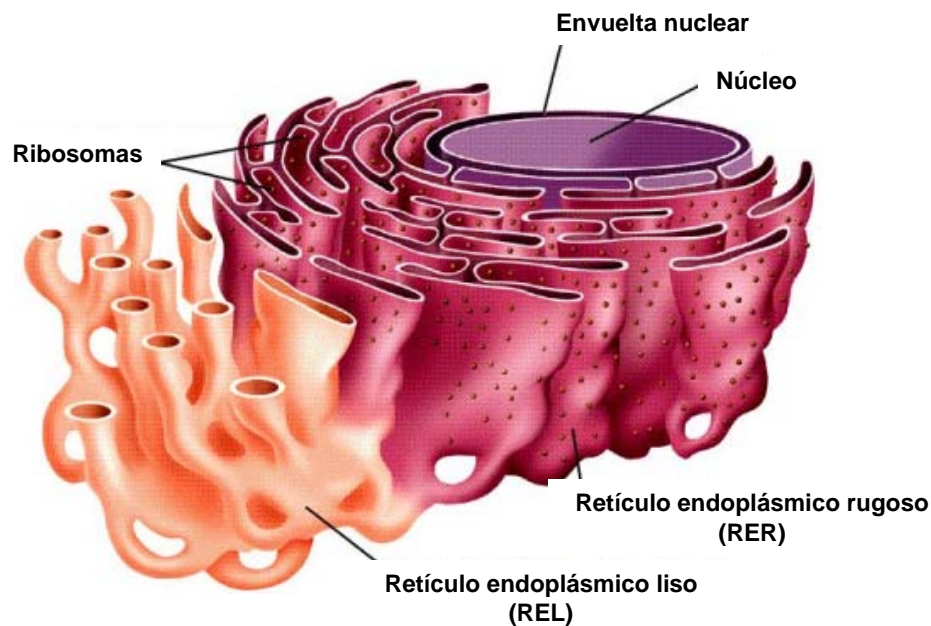


Figura 11. Esquema de la estructura del RE.

4.4.3. Función del RE

El RE tiene aspecto polimorfo, lo que daría lugar a diferentes interpretaciones funcionales. Función mecánica, el retículo con el sistema de membrana proporciona la estabilidad del citoplasma. Por otra parte la enorme superficie interna nos da idea del intercambio que se produce entre la matriz citoplasmática y el interior del RE. Las

INTRODUCCIÓN

membranas de los retículos poseen propiedades osmóticas, se produce transporte de sustancias que puede realizarse por transporte activo o pasivo. La presencia en el interior de la membrana nuclear y en el interior del RE de glucosa 6 fosfatasa ayuda al proceso de degradación de compuestos con alto poder energético. Aparecen también gradientes iónicos y potenciales bioeléctricos en estas membranas intracelulares. Este hecho de flujo de membranas y las continuidades entre la membrana nuclear y el RE sugiere que tiene que existir un flujo importante, que es en algunos casos, el único mecanismo de intercambio entre citoplasma y núcleo.

El Re participa en:

1. Síntesis de proteínas:

Las proteínas serán transportadas al aparato de Golgi mediante vesículas de transición donde dichas proteínas sufrirán un proceso de maduración para luego formar parte de los lisosomas o de vesículas secretoras.

El ARN mensajero es el que lleva la información para la síntesis de proteínas, es decir, determina el orden en que se unirán los aminoácidos. Esta información está codificada en forma de tripletes, cada tres bases constituyen un codón que determina un aminoácido. Las reglas de correspondencia entre codones y aminoácidos constituyen el código genético.

INTRODUCCIÓN

La síntesis de aminoácidos tiene lugar en los ribosomas del citoplasma. Los aminoácidos son transportados por el ARN de transferencia, específico para cada uno de ellos, y son llevados hasta el ARN mensajero, dónde se aparean el codón de éste y el anticodón del ARN de transferencia, por complementariedad de bases, y de ésta forma se sitúan en la posición que les corresponde.

Una vez finalizada la síntesis de una proteína, el ARN mensajero queda libre y puede ser leído de nuevo. De hecho, es muy frecuente que antes de que finalice una proteína ya está comenzando otra, con lo cual, una misma molécula de ARN mensajero, está siendo utilizada por varios ribosomas simultáneamente.

2. Metabolismo de lípidos:

Al REL, al no tener ribosomas le es imposible sintetizar proteínas pero sí sintetiza lípidos de la membrana plasmática, colesterol y derivados de éste como los ácidos biliares o las hormonas esteroideas.

3. Detoxificación:

Es un proceso que se lleva a cabo principalmente en las células del hígado y que consiste en la inactivación de productos tóxicos como drogas, medicamentos o los propios productos del metabolismo celular, por ser liposolubles (hepatocitos).

4. Glicosilación:

INTRODUCCIÓN

Son reacciones de transferencia de un oligosacárido a las proteínas sintetizadas. Se realiza en la membrana del RE. De este modo, la proteína sintetizada se transforma en una proteína periférica externa del glucocálix en la reproducción de lisosomas.

El RE es una organela con alta capacidad de retención de Ca^{2+} . La concentración de Ca^{2+} en el RE ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$), se ha estimado en unos 5-10 mM, si bien buena parte del mismo se encuentra unido a proteínas como la calreticulina, dejando concentraciones de Ca^{2+} libres que van desde el micromolar hasta 3 mM (Meldolesi y Pozzan, 1998; Alonso y col., 1999). El RE es un entorno idóneo para el procesamiento postraducciona l de proteínas (plegado, glicosilación...), que son maduras y empaquetadas en esta organela antes de alcanzar su destino final (generalmente, la membrana plasmática).

El Ca^{2+} del RE es dinámico y se encuentra en un continuo proceso de secuestro y liberación. Está implicado en varios procesos de señalización de Ca^{2+} intracelular (Verkhatsky, 2004; Berridge, 1993). Las alteraciones de la homeostasia del Ca^{2+} reticular pueden conducir a la expresión de señales citoprotectoras y/o apoptóticas con relevancia clínica en enfermedades neurodegenerativas (Paschen, 2003 a y b).

El RE no es una organela homogénea sino que consta de compartimentos diferenciados en cuanto a sus proteínas de membrana, sugiriendo que el RE puede generar y controlar una multitud de señales

INTRODUCCIÓN

de Ca^{2+} (Golovina y Blaustein, 1997). Alonso y colaboradores (1999) describieron diferencias cuantitativas en la salida de Ca^{2+} reticular inducida con cafeína e histamina, que indican la posible existencia de al menos dos depósitos de Ca^{2+} , uno dependiente de InsP_3 y uno InsP_3 -independiente (Cheek y col., 1991). Se conocen tres estructuras en la membrana del RE que gestionan la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$: la SERCA (del inglés "*Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*"), los RyR y los InsP_3R .

La SERCA es una ATPasa tipo P que toma Ca^{2+} del citosol y lo introduce en el lumen reticular en contra de gradiente electroquímico. El proceso requiere gasto energético en forma de ATP. Su afinidad por el Ca^{2+} está comprendida entre 0'1 y $1\ \mu\text{M}$. La inhibición de la SERCA, con tapsigargina por ejemplo, impide la entrada de Ca^{2+} en el RE y como consecuencia el depósito se va vaciando progresivamente (Alonso y col., 1999).

Los InsP_3R se encuentran en todos los tipos celulares. Son canales de Ca^{2+} activados por ligando, en concreto el InsP_3 , que se produce en el interior de la célula por la activación de la fosfolipasa C (PLC) que hidroliza el fosfatidilinositol bisfosfato de la membrana plasmática en InsP_3 y diacilglicerol (DAG). La activación de PLC puede inducirse por la unión de histamina a receptores histaminérgicos H1 de la membrana plasmática. El DAG a su vez activa la proteína cinasa C (PKC) que limita la salida de Ca^{2+} a través del InsP_3R . La apertura de los InsP_3R está regulada por la $[\text{Ca}^{2+}]$ extraluminal y adopta una curva de activación

INTRODUCCIÓN

en campana que tiene su máximo en torno a los 200 nM (Thrower y col., 1998; Bezprovanny y col., 1991). El InsP_3R se ha asociado con funciones de crecimiento y maduración, fertilización, extensión de neuritas, expresión génica y la secreción de neurotransmisores (Berridge, 1993). Farmacológicamente, podemos inhibir la activación de los InsP_3R mediante el fármaco permeable 2-APB (Maruyama y col., 1997).

Los RyR se activan por la presencia de Ca^{2+} extraluminal (Zucchi y Ronca- Testoni, 1997) y son responsables del fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} o CICR, según el cual diversos agentes que promueven incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ provocan liberación de Ca^{2+} del RE. Los RyR también presentan una curva de activación en campana, ocurriendo que la apertura del canal se inhibe a concentraciones de Ca^{2+} superiores a 150 μM (Meissner y col., 1986). El ion Ca^{2+} es el principal regulador conocido de los RyR, pero también son modulables fisiológicamente por ATP y Mg^{2+} , proteínas quelantes de Ca^{2+} (calmodulina y calsecuestrina) y fosforilación mediada por proteína cinasa A (Fill y Copello, 2002). La rianodina, un alcaloide de *Ryania speciosa*, además de dar nombre al canal, modula la actividad del mismo. Otro compuesto activo sobre el RyR es la cafeína, que actúa como agonista del canal a concentraciones milimolares (Cheek y col., 1993).

En muchas estirpes celulares, se ha identificado una corriente de entrada de iones Na^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática

INTRODUCCIÓN

consiguiente a la liberación de Ca^{2+} del RE. Este fenómeno se conoce como entrada de calcio operada por depósito (SOCE, "Store Operated Calcium Entry"). Su función más reconocida es la de suministrar iones Ca^{2+} para el rellenado del RE. La SOCE se puede inducir por agentes que originan salida de Ca^{2+} reticular, como taspigargina, cafeína o histamina (mediante la producción de DAG) (Robinson y col., 1992, Putney Jr., 2007).

Existe una estrecha relación entre la gestión del Ca^{2+} intracelular por el RE y la mitocondria y aquél que procede del medio extracelular a través de CCDV, el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ y la SOCE. Por un lado, la histamina y la cafeína, agonistas de los InsP_3R y RyR respectivamente, estimulan la salida de Ca^{2+} del RE. La proteína PKC también está relacionada con la movilización del Ca^{2+} del RE.

Se ha postulado la teoría de la tríada funcional, según la cual la señal de Ca^{2+} originada por apertura de CCDV sería modulada por el RE y la mitocondria. En el RE, el fenómeno de CICR ocurre tras la entrada masiva de Ca^{2+} por CCDV. Este Ca^{2+} de origen reticular amplificaría la señal de Ca^{2+} proveniente del exterior de la célula. La mitocondria es capaz en estas condiciones, de capturar grandes cantidades de Ca^{2+} a través del uniportador, de que libera progresivamente de vuelta al citosol.

INTRODUCCIÓN

Existe así mismo una comunicación entre RE y mitocondria ya que señal de Ca^{2+} generada por estimulación de InsP_3R es captada por la mitocondria (Montero y col., 2002). La señal de Ca^{2+} originada por la apertura de CCDV es distribuida por las organelas intracelulares en forma de microdominios que modulan la exocitosis (García y col., 2007).

Existen evidencias que asocian la actividad del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ del plasmalema con el depósito de Ca^{2+} del RE. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es una estructura protéica de membrana que transporta de forma antiparalela iones Na^+ y Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Este transporte se efectúa a favor de gradiente electroquímico para ambos iones y no requiere de gasto energético. La estequiometría de la reacción es de tres iones de Na^+ por uno de Ca^{2+} ; por lo tanto la actividad del intercambiador es electrogénica. Este intercambio puede producirse en cualquier sentido y se describen dos modos de funcionamiento del intercambiador: sacando iones Na^+ del citosol e introduciendo iones Ca^{2+} del medio extracelular (modo directo) o viceversa, introduciendo Ca^{2+} y extrayendo Na^+ (modo reverso). Este modo reverso se activaría en situaciones de elevación de la $[\text{Na}^+]_i$, como es el caso del modelo propuesto para la acción de los glucósidos cardiotónicos.

El bloqueo de la SERCA con tapsigargina disminuye la elevación de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ provocada por el modo reverso del intercambiador (Pan y col., 2006). También se postula que el intercambiador puede ser una

INTRODUCCIÓN

fuelle de Ca^{2+} para el relleno del RE (Hirota y col., 2007), mientras que, usando otros protocolos, otros autores han observado liberación de Ca^{2+} de esta organela debida a la activación del modo reverso del intercambiador (Wu y col., 2008). Diferentes isoformas del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pueden afectar de forma distinta al Ca^{2+} reticular y a la susceptibilidad celular a la sobrecarga de Ca^{2+} (Hurtado y col., 2006).

La SOCE genera una corriente inespecífica de Na^+ y Ca^{2+} . El Ca^{2+} que ingresa por los canales de calcio operados por depósito (SOCC, "Store Operated Calcium Channels") se utiliza para recargar el RE mediante la actividad de la SERCA. Además, el Na^+ que entra en la célula puede inducir la actividad reversa del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que introduciría más Ca^{2+} que también se utilizaría en el relleno del RE (Lemos y col., 2007).

Estos datos indican que existe un equilibrio funcional entre las organelas intracelulares y ciertas estructuras de la membrana plasmática, que afecta a la señal de Ca^{2+} intracelular.

4.5. Funciones de la apoptosis

1. Eliminación de tejidos dañados o infectados:

INTRODUCCIÓN

La apoptosis ocurre en células dañadas por tóxicos, radiaciones o estrés, en células tumorales o infectadas por un virus que no tienen posibilidad de ser reparadas.

2. Desarrollo:

Durante el desarrollo embrionario la apoptosis regula el crecimiento celular y tisular, y en algunos animales el paso de un estado de crecimiento al siguiente.

3. Homeostasis:

La proliferación de nuevas células tiene que ser compensada por la muerte de otras. La homeostasis se logra cuando la relación entre la mitosis y la muerte celular se encuentra en equilibrio.

4) Regulación del sistema inmunitario:

El desarrollo de un sistema inmune maduro y efectivo depende de una serie de reguladores positivos y negativos de las vías de apoptosis. Ciertas células del sistema inmunitario, como los linfocitos B y linfocitos T, son sofisticados agentes de la respuesta defensiva del organismo frente a infecciones, así como células propias que hayan adquirido o desarrollado algún tipo de malignidad. Para ello, deben tener la habilidad de discriminar lo propio de lo extraño y lo sano de lo enfermo. Después de activarse tienen la capacidad de migrar, proliferar y

reconocer las células afectadas, induciendo una respuesta de muerte celular programada.

4.6. Patologías vinculadas con la apoptosis

La apoptosis, es una función biológica de gran relevancia en la patogenia de varias enfermedades. Citamos algunos ejemplos a continuación:

1. Enfermedades asociadas a la inhibición de apoptosis:

Cáncer (King y Cidlowski, 1998; Kerr y col., 1994), enfermedades autoinmunes (Worth y col., 2006) e infecciones virales.

2. Enfermedades asociadas al aumento de apoptosis:

Infección por VIH (Li y col., 1995), enfermedad de Alzheimer (Ethell y Buhler, 2003), enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, anemia aplásica y daño isquémico.

4.7. Actualidad de la apoptosis

La apoptosis ha sido tema de creciente atención en la biología celular y en el estudio del desarrollo de los organismos, así como en la investigación de enfermedades tales como el cáncer. Así lo demuestra

INTRODUCCIÓN

el hecho que el premio Nobel año 2002 para Fisiología y Medicina fuese otorgado a Sydney Brenner, H. Robert Horvitz y John E. Sulston "por sus descubrimientos concernientes a la regulación genética del desarrollo de órganos y la muerte celular programada". Tal y como afirmó el jurado, "sus avances ayudaron a comprender muchas enfermedades como el SIDA, las enfermedades degenerativas y los accidentes cerebrales y cardíacos".

Brenner (1927), Sulston (1942) y Horvitz (1947) identificaron los genes que provocan la muerte de las células como parte del crecimiento del cuerpo. Cuando éstas no mueren a tiempo, pueden desarrollarse patologías como el cáncer. En cambio, la desaparición prematura, puede conducir a ataques cerebrales y cardíacos. Gracias a estos descubrimientos sabemos que la muerte celular programada no sólo no tiene por qué ser un proceso anómalo o patológico, sino que es esencial para la organización de los animales pluricelulares.

Actualmente, muchos de los tratamientos que los científicos están desarrollando para el tratamiento de numerosas patologías están enfocados en el "programa suicida" de los tejidos. El conocimiento de la regulación celular y molecular de la apoptosis, podría llevar incluso a estrategias terapéuticas en las que se provoque específicamente el suicidio de células "indeseables", bien porque sean tumorales o porque su existencia favorezca el crecimiento o la diseminación del cáncer.

II. Objetivos

OBJETIVOS

La bomba de Na^+ (Na^+/K^+ ATPasa dependiente de Mg^{2+}) del plasmalema está implicada en la regulación del potencial de membrana de prácticamente todas las células de los mamíferos. Esta regulación es particularmente relevante en las células excitables del corazón y las neuronas, que están descargando continuamente potenciales de acción. En estas células, la bomba de Na^+ trabaja continuamente para restablecer las concentraciones asimétricas de Na^+ y K^+ a uno y otro lado del plasmalema. En este contexto, cabe destacar que la provisión de ATP por la mitocondria es altamente relevante para satisfacer las necesidades energéticas de la neurona. De hecho, las alteraciones de la Na^+/K^+ ATPasa y de la mitocondria se han asociado a algunas enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Por ello, nuestro interés en esta tesis doctoral se ha centrado en la investigación del mecanismo por el cual podría inducir apoptosis la ouabaína, que inhibe selectivamente la Na^+/K^+ ATPasa plasmalemal.

El objetivo de esta tesis ha sido profundizar en los mecanismos de muerte celular inducidos por el digitálico ouabaína, en un modelo de células HeLa. La ouabaína ejerce su acción a través de su unión a la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática celular, provocando un incremento en la concentración del ión Na^+ , que pone a funcionar en modo reverso al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática introduciendo Ca^{2+} al interior celular, el cual resulta tóxico

OBJETIVOS

para la célula. Además la bomba puede actuar como un transductor de señales y activar distintas cascadas intracelulares.

El papel que esta bomba juega en numerosas patologías y las implicaciones clínicas que pudieran surgir de su manipulación farmacológica están siendo ampliamente investigadas en numerosos laboratorios. Algunas investigaciones recientes demuestran que los cerebros de pacientes afectados de ELA tienen una actividad de la bomba Na^+K^+ ATPasa disminuida y que ésta podría plantearse como una posible diana terapéutica.

En este trabajo nos planteamos como **objetivo general** evaluar el efecto del digitálico ouabaina en la línea celular HeLa. Para ello nuestros **objetivos específicos** fueron:

- Caracterizar las células HeLa. Para ello estudiamos su respuesta a diferentes estímulos tóxicos.
- Establecer la toxicidad del digitálico en nuestro modelo celular realizando curvas de concentración y tiempo.
- Puesta a punto de técnicas de laboratorio que permitieran el estudio del ciclo celular y la apoptosis, evaluación de la viabilidad celular, determinación de diferentes caspasas y niveles celulares de ATP, realización de medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ y determinación de niveles de citocromo c en nuestro modelo celular.

OBJETIVOS

- Evaluar la eficacia de posibles compuestos protectores frente a la toxicidad ouabaínica.
- Profundizar en el mecanismo de toxicidad de la ouabaína en las células HeLa.

III. Métodos y Materiales

1- Métodos

1.1. Células HeLa

El trabajo recogido en ésta memoria se ha realizado empleando células HeLa conservadas en el Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa, pertenecientes al Instituto Teófilo Hernando de la Universidad Autónoma de Madrid.

1.1.1. Preparación y mantenimiento del cultivo celular

Las células HeLa presentan una morfología poligonal característica, son de gran tamaño, adherentes y en cultivo crecen en monocapa. En el laboratorio se mantuvieron en una botella de plástico estéril de 75 cm². El medio de cultivo utilizado fue Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés "*Dulbecco's Modified Eagle Medium*", DMEM) con alta concentración de glucosa (4500 mg/l) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF), 2 mM de L-Glutamina y una solución de antibióticos (50 UI/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina). Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador a 37°C, con una atmósfera de aire (95%) y CO₂ (5%), saturada de humedad. El medio de cultivo se sustituyó cada 2 días por medio de cultivo fresco, y cuando las células estaban confluentes (70-80%) se realizó un pase añadiendo tripsina-EDTA.

Para su almacenamiento, se congelaron en N₂ líquido (-173°C) en UN 75% de SBF inactivado y un 25% de medio de cultivo HeLa.

1.2. Estudio de los digitálicos

1.2.1. Análisis de la morfología celular mediante microscopía óptica

Uno de los cambios más evidentes que acusan las células en cultivo cuando están sufriendo apoptosis es la transformación de su habitual morfología en una más redondeada y sin prolongaciones, vacuolización y la aparición de los llamados cuerpos apoptóticos. Además, una de las características más importantes de las células no hematopoyéticas, como la adherencia a la superficie de cultivo, se pierde provocando que las células queden en suspensión en el medio de cultivo (Atienza y col., 2005).

Para la toma de imágenes, las células se sembraron en placas de plástico estéril de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células /pocillo. A las 24 h, cuando alcanzaban una confluencia de aproximadamente el 80%, se incubaron a distintos tiempos (2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h) con concentraciones crecientes de ouabaína (0,03, 0,3, 0,1, 1, 3, 10 y 100 μ M), dejando un pocillo control sin tratamiento. Transcurrido el tiempo de incubación correspondiente, se tomaron imágenes con distintos

aumentos (10x, 20x y 40x) de todos los pocillos empleando una cámara fotográfica digital acoplada a un microscopio Nikon Eclipse TS100.

1.2.2. Análisis de la fragmentación del ADN y estudio del ciclo celular por citometría de flujo

1.2.2.1. Fundamento de la citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico que permite analizar de manera simultánea diversas características celulares. Esta técnica se fundamenta en el análisis de las señales luminosas generadas al incidir un haz de luz sobre una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas. El impacto del haz de luz en cada célula produce señales luminosas, que corresponden a diferentes parámetros de la célula, y son recogidas por distintos detectores. Estos parámetros proporcionan información de características físicas de la célula, como el tamaño (señal de difracción del haz de luz) y la complejidad de su núcleo y citoplasma (señal de dispersión del haz de luz). Además, los citómetros de flujo son capaces de recoger una o más señales fluorescentes procedentes de fluorocromos asociados a partículas celulares, cuando estos fluorocromos son excitados por el haz luminoso. Un ejemplo es el yoduro de propidio unido al ADN (señal de fluorescencia).

MÉTODOS Y MATERIALES

Los parámetros que típicamente se miden de forma simultánea en cada célula son los siguientes:

- Señales de dispersión: resultan de un cambio de dirección de la luz (no de la longitud de onda) en todas las direcciones del espacio. La dispersión de la luz depende de características morfológicas de la célula como su tamaño y complejidad. En los citómetros de flujo se miden dos señales de dispersión: la luz dispersada en un ángulo agudo pequeño ($0-10^\circ$), coincidente con la dirección de la luz incidente, llamada FSC (del inglés "*Forward Scatter*") (componente de dispersión frontal) y que es proporcional al tamaño celular, y la luz dispersada en ángulo recto llamada SSC (del inglés "*Side Scatter*") (componente de dispersión lateral) y que está relacionada con la complejidad de la estructura interna de la célula (granularidad).

- Señales de fluorescencia: Proviene de fluoróforos capaces de reconocer componentes específicos de determinados componentes celulares. En el punto de interacción con el haz de luz, cada célula emite una señal fluorescente cuya intensidad es proporcional a la cantidad de moléculas de fluoróforos que porte. Los detectores recogen la fluorescencia emitida y transforman esta señal en pulsos eléctricos que, una vez digitalizados, son procesados por equipos informáticos.

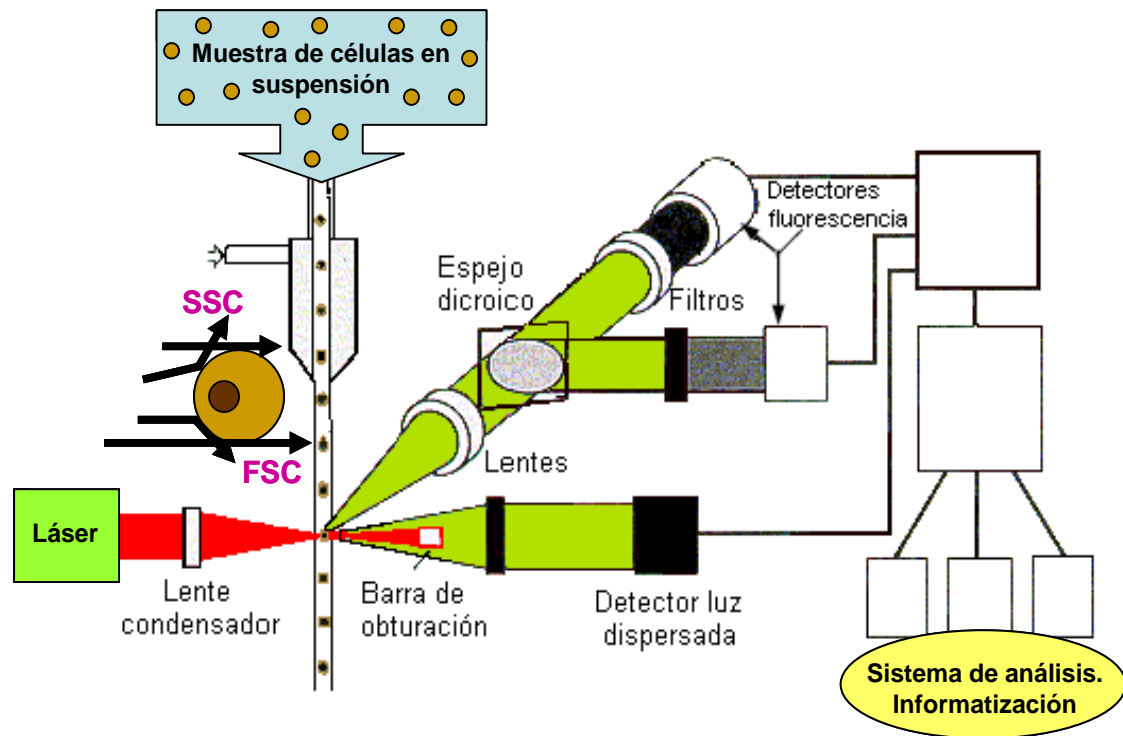


Figura 12. Esquema de un citómetro de flujo. Las partículas en una suspensión isotónica pasan alineadas en la cámara de flujo. Al llegar al haz de luz de láser, emiten luz fluorescente y dispersa que pasará a través de distintos filtros para ser separada en función de su dirección y longitud de onda. La señal luminosa se recoge en un detector y posteriormente se analiza con un sistema informático. El citómetro detecta la fluorescencia que emiten las células de una muestra tras ser iluminadas por el láser y recoge las señales de dispersión SSC y FSC.

Debido a la necesidad de utilizar partículas en suspensión (células, núcleos, cromosomas) para ser leídos de una en una, hace que se pierda información sobre la arquitectura de los tejidos que componen

las células o de las propias células, así como de la interacción de éstas y el medio que las rodea. Frente a este inconveniente, la citometría de flujo presenta múltiples ventajas como:

- Posibilidad de empleo de múltiples marcajes.
- Posibilidad de analizar un elevado número de partículas en un corto período de tiempo (5000 partículas/segundo).
- Posibilidad de cuantificar la intensidad antigénica por medio de los canales de fluorescencia.
- Gran sensibilidad y objetividad, que le permiten detectar y caracterizar poblaciones celulares poco abundantes.
- Posibilidad de analizar poblaciones celulares y epítopos celulares.
- Permite almacenar informáticamente los resultados del análisis para poder utilizarlos en cualquier momento y reanalizar datos anteriores.
- Posibilidad de cuantificar las moléculas antigénicas presentes en un grupo celular.

1.2.2.2. Fragmentación de ADN y estudio del ciclo celular

La fragmentación del ADN es un fenómeno característico de la muerte celular apoptótica que puede detectarse por la aparición de una población de células con contenido de ADN inferior al contenido

diploide correspondiente a una célula en reposo (Nicoletti y col., 1991; Robinson y col., 1997).

La cuantificación de ácidos nucleicos encaminada al análisis del ciclo celular permite detectar el número de células en cada una de las fases del ciclo, así como posibles alteraciones en la carga genética. En condiciones normales, las células somáticas que no están en división tienen un contenido diploide ($2n$) de ADN y se encuentran en la fase G₀/G₁ del ciclo celular. La síntesis de ADN durante la fase S del ciclo lleva a un incremento en el contenido de ADN, alcanzando una dotación $4n$ al final de la misma, que se mantiene durante la fase G₂ y hasta la fase M. Como resultado de la fase M la célula dará lugar a dos células hijas con contenido diploide. El ciclo celular se representa de forma esquemática en la **figura 13**.

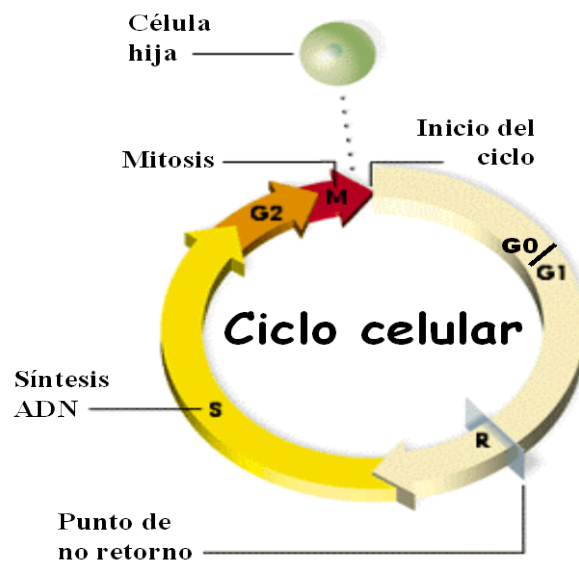


Figura 13. Esquema del ciclo celular. En condiciones normales las células somáticas que no están en división, tienen un contenido diploide ($2n$) de ADN y se encuentran en la fase G₀/G₁ del ciclo celular. La síntesis de ADN durante la fase S del ciclo lleva a un incremento en el contenido de ADN alcanzando una dotación $4n$ al final de la misma, que se mantiene durante la fase G₂ y M. Como resultado de la fase M la célula dará lugar a dos células hijas con contenido diploide.

Una de las sondas más empleadas para determinar la cantidad celular de ADN es el yoduro de propidio, una sustancia rojo-naranja fluorescente que se intercala en los ácidos nucleicos de doble cadena. La cantidad de fluorescencia emitida es proporcional al contenido de ADN de cada célula. Durante el proceso apoptótico la ruptura internucleosomal del ADN se visualiza como un pico hipodiploide (contenido inferior a $2n$) al representar una distribución de frecuencias

MÉTODOS Y MATERIALES

del contenido de ADN de una población celular teñida con yoduro de propidio (Nicoletti y col., 1991; Robinson y col., 1997).

En los resultados que se muestran en esta memoria, la apoptosis se cuantificó analizando el contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular, tiñendo las células con yoduro de propidio (Nicoletti y col., 1991; Robinson y col., 1997). Se sembraron las células en placas de 6 pocillos de plástico estéril a una densidad de 3×10^5 células/pocillo. Pasadas 24 h, cuando alcanzaron una confluencia del 80%, se trataron con concentraciones crecientes de ouabaína (0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 y 100 μ M) durante distintos tiempos (2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h). Posteriormente las células se recogieron en tampón fosfato frío (PBS), se centrifugaron (800 rpm durante 10 min) y se fijaron en etanol (70%) a 4°C durante 4-24 h. Pasado este tiempo se lavaron con PBS y se marcaron con una solución de yoduro de propidio (20 μ g/ml), ribonucleasa A (0,2 mg/ml) y tritón (0,1%) durante 15 min a 37°C ó 30 min a temperatura ambiente.

Las células se analizaron en un citómetro de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences CellquestPro software) siguiendo la plantilla de la **figura 14**. El primer paso de este análisis fue seleccionar las partículas celulares compatibles con nuestra población celular por tamaño y complejidad (R1) (Figura 14A). De esta primera selección, eliminamos los dobletes y resto de asociaciones celulares (R2) (Figura 14B). El estudio del contenido de ADN se realizó en las células de ésta región R2. En las partículas individuales se cuantificó la intensidad de fluorescencia del

yoduro de propidio por área, para estimar la cantidad de ADN de esa partícula, y la representamos en un diagrama de frecuencias (Figura 14C).

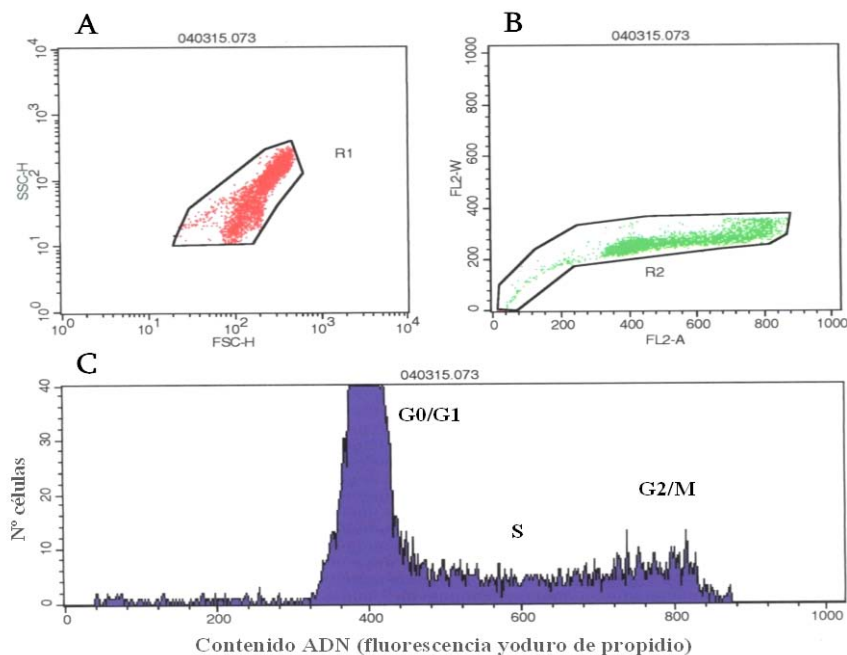


Figura 14. Análisis del ciclo celular en la línea HeLa. En el diagrama A se selecciona la población de células (R1) en base a sus características de tamaño (FSC, abscisa) y de complejidad (SSC, ordenada). Para evitar la cuantificación de ADN correspondiente a grupos de dos o más células se representa el diagrama FL2-A, abscisa, frente a FL2-W, ordenada, y en las células de esta región (R2) se realiza el estudio del contenido de ADN (panel B). El panel C representa la distribución del contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular.

En esta gráfica se representa el número de células (eje y) frente a la fluorescencia emitida por el yoduro de propidio unido al ADN (eje x). Los valores de fluorescencia se fijaron en torno a 400 para las células

MÉTODOS Y MATERIALES

diploides que se encuentran en fase G0/G1 del ciclo celular y las células que presentan una dotación $4n$ muestran valores de fluorescencia en torno a 800 encontrándose en fase G2/M.

La apoptosis se cuantificó como el porcentaje de partículas que tienen un contenido de ADN inferior a $2n$ (Robinson y col., 1997). Las células con dotación cromosómica inferior a $2n$ se distribuyen a la izquierda de 400, correspondiendo a las células que han sufrido fragmentación del ADN y por lo tanto apoptosis. El programa informático utilizado, CellQuest, nos permite cuantificar el porcentaje de células, del total de la población analizada (5000 células por cada variable experimental), que se distribuye en cada fase del ciclo celular, y también las células apoptóticas.

1.2.3. Determinación de la viabilidad celular mediante MTT

Este método fue desarrollado por Mossmann en 1983 y posteriormente modificado en 1986 por Francois Denizot y Lang Rita. Se fundamenta en la reducción metabólica del bromuro (3- [4, 5-dimetiltiazol-2-il]-2, 5-difenilo) (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en una sal de formazán de color azul, tal y como muestra la **figura 15**. Es un ensayo colorimétrico no radiactivo basado en una cuantificación espectrofotométrica en el que el valor de absorbancia obtenido es proporcional al número de células

MÉTODOS Y MATERIALES

metabólicamente activas (capaces de reducir MTT). Permite valorar la viabilidad celular y la actividad mitocondrial de forma directa, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de sal de formazán formada. Ha sido ampliamente utilizado también para medir de forma indirecta la supervivencia y proliferación celular frente a diferentes estímulos (Weichert H. y col., 1991; Zhang Y. y col. 2011).

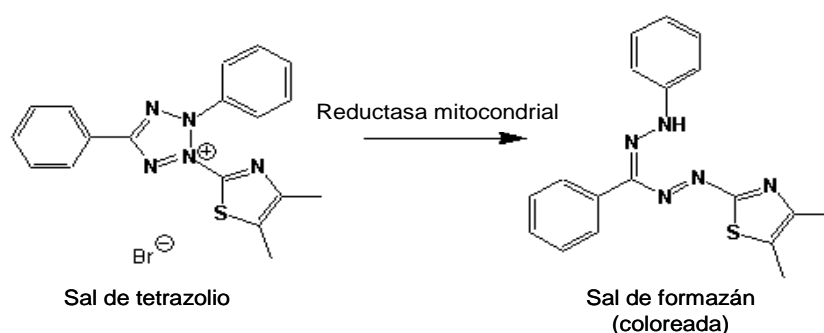


Figura 15. Reacción de reducción del MTT. La sal de tetrazolio se transforma en un precipitado, una sal de formazán coloreada e insoluble, por la acción de la reductasa mitocondrial.

Para determinar la viabilidad se sembraron las células en placas de plástico estéril de 48 pocillos a una densidad de 120.000 células/pocillo. Tras 24 h y una confluencia aproximada del 80%, se trataron con 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 y 10 μM de ouabaína durante 24 h (100 μL /pocillo). Se eliminaron los medios de los pocillos y a cada uno se le añadió 50 μL de reactivo de MTT (98% TLC) durante 1 h 30 min tiempo en el que se formaron los cristales de formazán; después se añadieron 150 μL de

DMSO en cada pocillo y se resuspendió el contenido. Del volumen total de cada pocillo, se pasaron 100 µL a una placa de plástico de 96 pocillos en la que se realizó la determinación. Empleando un lector de Elisa (Berthold Detection Systems, Sirius) se realizó la lectura de la densidad óptica (DO) a 540 nm. La viabilidad celular, expresada como porcentaje respecto al control, se calculó siguiendo la siguiente ecuación: Viabilidad = (DO test/ DO control) x100.

1.2.4. Determinación de la activación de caspasas

Las caspasas son una gran familia de proteasas homólogas entre sí que se activan en las células apoptóticas (Alnemri y col., 1996). Las caspasas son cisteína proteasas específicas de ácido aspártico que poseen un requerimiento absoluto de cortar después de un residuo de éste ácido escindiendo el sustrato en dos unidades. Se encuentran altamente conservadas en la evolución y están presentes desde humanos, pasando por insectos y nematodos hasta la Hidra (Budihardjo y col., 1999).

El primer miembro identificado de esta gran familia fue la caspasa-1 o enzima convertidora de interleukina-1 b (ICE), responsable de la maduración de la pro-interleukina 1b a su forma pro-inflamatoria y biológicamente activa (Cerretti y col., 1992; Thornberry y col., 1992). Las caspasas comparten similitudes en la secuencia de aminoácidos, en la

MÉTODOS Y MATERIALES

estructura y especificidad de sustratos. Son sintetizadas como zimógenos que tienen que ser cortadas proteolíticamente para activarse y poder ejercer su función. La presencia de ácido aspártico en los sitios de corte es consistente con la habilidad de las caspasas de autoactivarse o de ser activadas por otras caspasas como parte de una cascada de amplificación. Una forma de activar una caspasa es exponerla a otra previamente activada (activación autocatalítica por cascada de caspasas). Esto sucede en las llamadas *caspasas efectoras* que son la -3, la -6 y la -7. La primera caspasa que se activa, *caspasa iniciadora*, puede hacerlo: 1) Por proximidad a un tóxico (caso de los receptores de muerte situados en la membrana plasmática) y dentro de estas la caspasa-8 es clave. 2) Por asociación con una subunidad reguladora o cofactor de proteínas como el factor activador de la apoptosis (Apaf-1). En este grupo la activación más compleja la posee la caspasa-9 ya que es necesaria la liberación del citocromo c por la mitocondria y el ATP. En resumen, las caspasas efectoras se activan proteolíticamente por otras caspasas mientras que las iniciadoras son activadas por interacciones reguladas proteína-proteína.

La caspasa más prevalente en la célula es la caspasa-3 que es la última responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos junto con las caspasas -6 y -7. Por ejemplo la fragmentación del ADN es debida a la acción de la caspasa-3 sobre un complejo ADNsa activado por caspasa (Liu y col., 1997; Enari y col., 1998 y la externalización de la

MÉTODOS Y MATERIALES

fosfatidilserina en los estadios iniciales de la apoptosis es también dependiente de caspasas (Martin y col., 1996).

Tradicionalmente, uno de los marcadores universales de apoptosis ha sido la activación de caspasas. En los últimos años se ha descubierto que las caspasas -8 y -3, iniciadora y efectora respectivamente, no sólo se activan cuando la apoptosis se ha iniciado, si no que también pueden hacerlo y funcionar como moléculas señalizadoras en algunos procesos como la inflamación o la diferenciación de precursores hematopoyéticos, sin que ésta activación resulte letal para la célula. Del mismo modo, la muerte celular que cursa con los cambios morfológicos típicos de la apoptosis, no siempre está ligada a una activación de caspasas. A pesar de estos datos, la actividad de las caspasas sigue siendo hoy día un marcador importantísimo en el estudio de la apoptosis (Kroemer y col., 2009).

Para la determinación de la activación de caspasas se emplearon kits comerciales adecuados para cada una de ellas, basados en ensayos de luminiscencia y se siguieron todas las indicaciones del fabricante. Estudiamos las caspasas-3/7, -8 y -9. Cada kit contiene un sustrato luminogénico para la caspasa en estudio en un reactivo optimizado para la determinación de la actividad de las caspasas, la luciferasa y para la lisis celular. La adición del reactivo de caspasas provoca la lisis celular favoreciendo la unión de la caspasa a su sustrato, hecho que se traduce en una señal luminosa producida por la

MÉTODOS Y MATERIALES

luciferasa. La luminiscencia obtenida es proporcional a la actividad de la caspasa en la muestra.

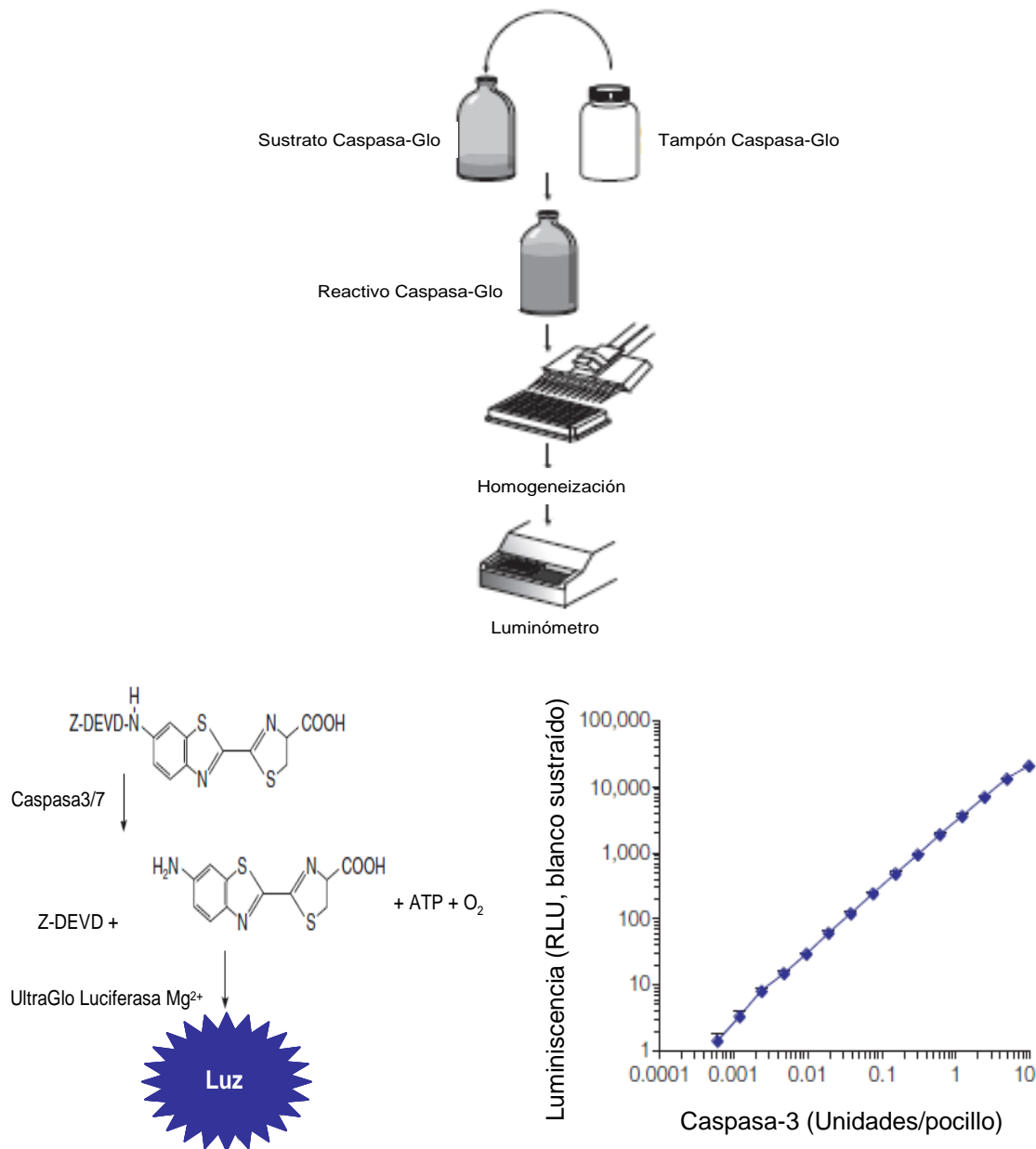


Figura 16. Esquema de la determinación de caspasas. Unión del reactivo de caspasa-3/7 a su sustrato. Después de la unión a la caspasa, se libera amino-luciferina, sustrato de la luciferasa, que originará una señal luminosa que es proporcional a la actividad de la caspasa-3.

MÉTODOS Y MATERIALES

Para realizar los experimentos de activación de caspasas, se sembraron las células en placas de 96 pocillos de plástico estéril de fondo negro a una densidad de 1×10^4 células/pocillo. Transcurridas 24 h cuando la confluencia era aproximadamente del 80%, se realizaron los tratamientos correspondientes. Se destinaron algunos pocillos libres de células a establecer unas condiciones basales de luminiscencia en los que se añadió exclusivamente el reactivo de caspasas y el medio de cultivo. Otros pocillos se emplearon para los controles negativos; en ellos las células estaban exentas de tratamientos y sólo se les añadió el reactivo de caspasas. Como control positivo de apoptosis y de activación de caspasas se empleó estaurosporina ($1 \mu\text{M}$) durante 5 h (Niles y col., 2007). La incubación con ouabaína ($0,3 \mu\text{M}$) se realizó a distintos tiempos (2, 3, 4, 5, 12 y 24 h) para hacer un curso temporal de la activación de caspasas. Las lecturas se realizaron en un lector de placas de Promega modelo Multi Detection System Glomax (Promega Biotech ibérica S.L).

1.2.5. Medida de los niveles celulares de ATP

La muerte celular está regulada a distintos niveles. Uno de los puntos de partida para iniciarla, son las mitocondrias (Kelly y Strasser, 2011). En situaciones patológicas, la función mitocondrial se altera, se despolariza la mitocondria lo que conduce a una caída en los niveles

MÉTODOS Y MATERIALES

de ATP y a la apertura del poro de transición mitocondrial, por el que se liberan al citoplasma partículas pro-apoptóticas como el citocromo c. Una vez en el citoplasma, éste se une a la proteína apaf-1 (factor activador de la apoptosis) dando lugar a la formación del apoptosoma (Cain y col., 1999), que activará las caspasas iniciadoras de la apoptosis y toda la cascada apoptótica (Martin y col., 1996; Liu y col., 1997; Enari y col., 1998; Kroemer y col., 2009). Una de las herramientas más reconocidas para el estudio de la apoptosis y del daño mitocondrial es el contenido celular de ATP, que disminuye cuando el metabolismo celular está comprometido.

Para la realización de las medidas celulares de ATP, reflejo del metabolismo y número de células viables, se empleó un kit comercial basado en ensayos de luminiscencia y se siguieron todas las indicaciones del fabricante. La adición del reactivo de ATP provoca la lisis celular propiciando la unión a su sustrato, hecho que se traduce en una señal luminosa producida por la enzima luciferasa. La luminiscencia obtenida es proporcional a la cantidad de ATP en la muestra.

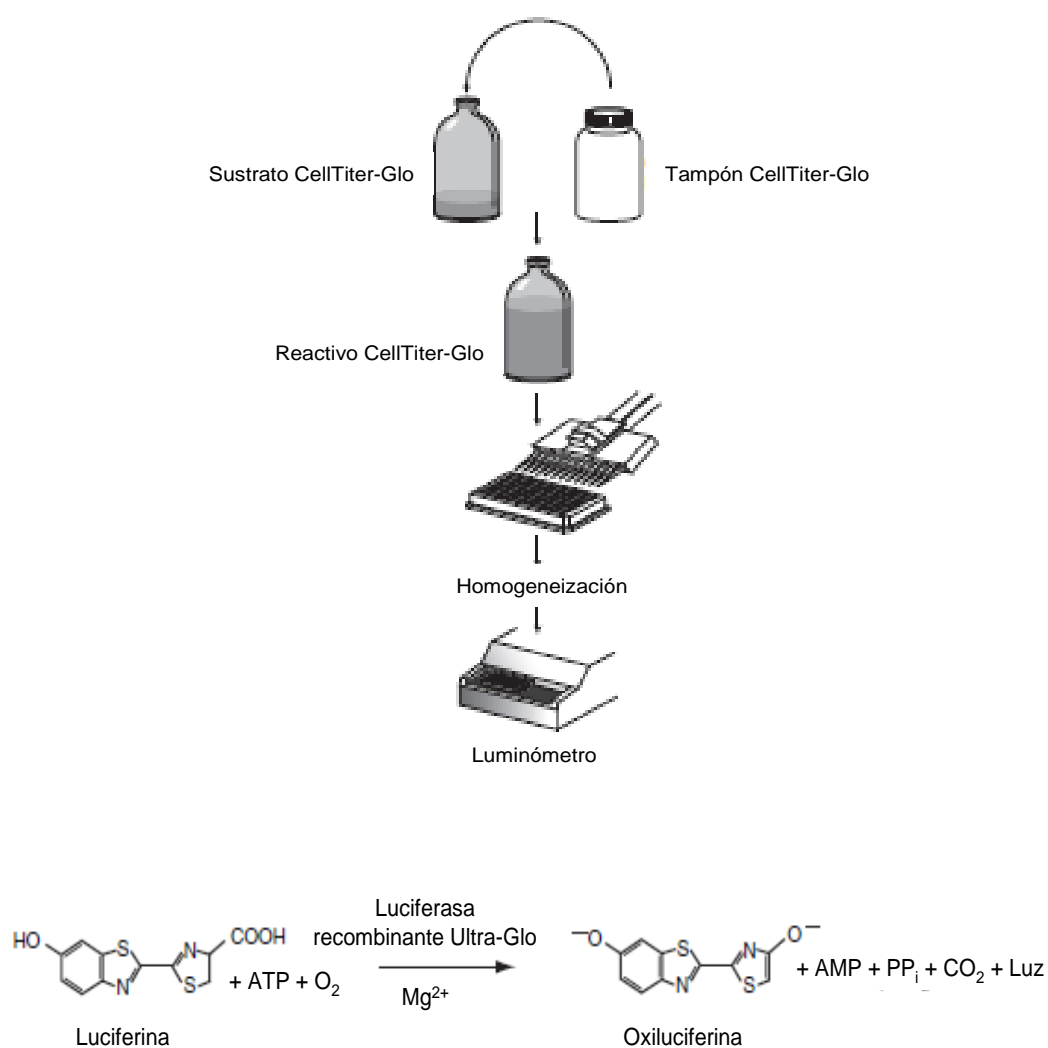


Figura 17. Esquema de la determinación de ATP. La monooxigenación de la luciferina es catalizada por la luciferasa en presencia de Mg^{2+} , ATP y oxígeno. La señal luminosa que se obtiene es proporcional al número de células y a la cantidad de ATP.

Para determinar el contenido celular de ATP, se sembraron las células en placas de 96 pocillos de plástico estéril de fondo negro a una densidad de 1×10^4 células/pocillo. Tras 24 h, cuando las células alcanzaron una confluencia aproximada del 80%, se realizaron los

tratamientos correspondientes. Se destinaron algunos pocillos libres de células a establecer unas condiciones basales de luminiscencia en los que se añadió exclusivamente el reactivo de ATP y el medio de cultivo. Otros pocillos se emplearon para los controles negativos; en ellos las células estaban exentas de tratamientos y sólo se les añadió el reactivo de ATP. Como control positivo de apoptosis se empleó estaurosporina (1 μ M) durante 5 h (Niles y col., 2007). La incubación con ouabaína 0,3 μ M se realizó a distintos tiempos (2, 3, 4 y 5 h) basándonos en los tiempos en los que previamente se había observado activación de caspasas. Las lecturas se realizaron en un lector de placas de Promega modelo Multi Detection System Glomax (Promega Biotech ibérica S.L.).

1.2.6. Localización de la ouabaína en las células HeLa

1. 2. 6. 1. Microscopía confocal

Para estudiar la distribución subcelular de la ouabaína empleamos la microscopía confocal ya que supone una mejora sustancial de las técnicas clásicas de microscopía óptica (campo claro y fluorescencia).

Entre sus ventajas están una mayor resolución, mejor contraste, la posibilidad de realizar secciones ópticas y reconstrucciones 3D y 4D, el análisis de imágenes digitalizadas y de sus combinaciones. Sus desventajas con respecto a los microscopios de fluorescencia son una

menor velocidad de captura e intensidades de excitación mayores. Además, el tiempo de exposición de las preparaciones a una fuente de luz de gran intensidad es superior al utilizado en microscopía convencional. Su éxito se debe a la obtención de imágenes de mayor nitidez y contraste y resolución. En las técnicas clásicas de observación en microscopía óptica, la luz interacciona con la muestra a varias profundidades por lo que la imagen que llega al observador presenta áreas borrosas debido a la luz procedente de zonas fuera del plano de enfoque, lo que produce una degradación en el contraste y resolución de la imagen.

La invención del primer microscopio confocal se le suele atribuir a Marvin Minsky, quien en 1955 diseñó un microscopio que le permitía observar redes neuronales en preparaciones de tejido nervioso no teñidas. La mayoría de los sistemas confocales modernos se basan en el principio por él patentado en 1957. Su diseño original se basaba en la presencia de dos colimadores delimitantes de orificios (del inglés “*pinhole*”), uno situado entre la fuente de luz y el objetivo, y otro entre el objetivo y un fotomultiplicador. Ambos debían estar perfectamente alineados (confocalizados), de manera que el segundo de ellos no dejara pasar al fotomultiplicador la luz “fuera del plano focal”, que es la base de todo sistema confocal. Sin embargo, la tecnología aún no disponible por entonces no le permitió demostrar todo el potencial de esta nueva técnica de microscopía, sobre todo en lo referente a

MÉTODOS Y MATERIALES

muestras biológicas. Ha sido el espectacular desarrollo de la tecnología láser, de la informática y de los sistemas de adquisición digital de imagen lo que ha permitido conocer todas las posibilidades de la microscopía confocal e implantar su uso generalizado en el campo de la biología durante los últimos veinte años.

El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces de los planos procedentes de los planos inferiores y superiores. La luz de excitación (procedente de uno o varios láseres) ilumina áreas muy precisas de la preparación y la luz fluorescente emitida es conducida hacia un "pinhole". Esto supone una gran ventaja, ya que la luz no procedente del plano focal, no podrá atravesarlo y no será detectada.

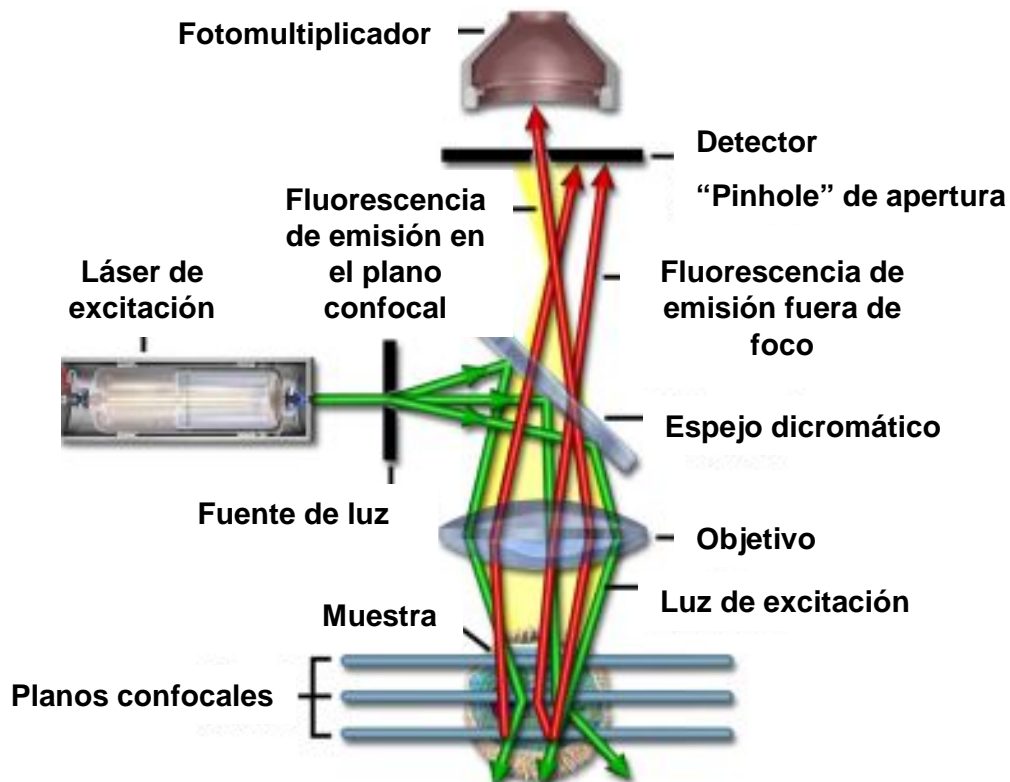


Figura 18. Esquema de un microscopio confocal.

1.2.6.2. Localización celular del digitálico. Internalización

Para los experimentos de localización del digitálico, las células se sembraron en portaobjetos de vidrio de 22 mm de diámetro colocados en placas de plástico estéril de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo. Tras 24 h se trataron con ouabaína o con un derivado fluorescente verde conocido como ouabaína-Bodipy FL® a las concentraciones de 0,03 y 0,3 μM durante distintos tiempos (3, 4, 5, 12,

MÉTODOS Y MATERIALES

24 h). Los controles quedaron exentos de tratamiento. Una vez finalizada la exposición, se lavaron los portaobjetos con una solución Krebs Hepes a pH 7,4 cuya composición en mM era 145 NaCl, 5,9 KCl, 1,2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 D-glucosa, 10 HEPES, se colocaron en la cámara apropiada y se realizaron los registros de las imágenes secuenciales en el plano Z cada 1 µm de espesor, desde el fondo del cubreobjetos hasta el ápice superior de las células. La longitud de excitación fue de 440 nm y la de emisión de 480 nm. Las imágenes se obtuvieron y analizaron empleando un microscopio confocal Leica SP5 con un objetivo 63x y el software LCS Lite y Leica Application Suite AF 1.8.1 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania), manteniendo una temperatura de 37^a C y un 5% de CO₂.

Además de esto, para ver si la unión del digitálico a la bomba Na⁺/K⁺ ATPasa era uniforme a lo largo de toda la membrana celular, si se internalizaba y cuándo lo hacía, se realizaron también algunos experimentos "in vivo" durante 24 h. Para ello las células se sembraron en portaobjetos de vidrio de 22 mm de diámetro colocados en placas de plástico estéril de 6 pocillos a una densidad de 3x10⁵ células/pocillo. Tras 24 h los portaobjetos se lavaron en la solución de lavado ya descrita y se colocaron en una cámara apropiada para este tipo de registro que evita la evaporación y mantiene las células en condiciones óptimas. Aquí es donde se añadió la ouabaína o la ouabaína-Bodipy 0,3 µM durante 24 h y dónde se realizaron los registros secuenciales en el eje Z de 0,2 µm, cada 15 min en una región de interés (ROI) del cubreobjetos

desde el inicio del tratamiento y hasta transcurridas 24 h. También se hicieron registros breves tomando imágenes cada 30 s. Las imágenes y videos se obtuvieron y analizaron empleando un microscopio confocal Leica SP5 con un objetivo 63x y el software LCS Lite y Leica Application Suite AF 1.8.1 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania), manteniendo una temperatura de 37^a C y un 5% de CO₂.

1.2.6.3. Dianas intracelulares del digitálico

Para determinar las posibles dianas celulares del digitálico, se hicieron ensayos de co-localización con el derivado fluorescente ouabaína-BODIPY FL[®] en distintas organelas como el RE y la mitocondria. La ouabaína-BODIPY FL[®] empleada era de color verde por lo que las sondas elegidas para el estudio de la posible co-localización en estas organelas celulares se escogieron de color rojo. Concretamente para la mitocondria empleamos Tetrametilrodamina etil éster ("TMRE") y para el RE "ER-tracker". En el caso de haber co-localización de la ouabaína fluorescente verde con alguna de estas organelas, el color que se observaría sería amarillo-anaranjado.

1- Para el estudio de la co-localización con el RE, se empleó la sonda permeable ER-tracker que marca de forma selectiva el RE de las células vivas y que a bajas concentraciones no es tóxica para las células.

MÉTODOS Y MATERIALES

Las células se sembraron en portaobjetos de vidrio de 22 mm de diámetro colocados en placas de plástico estéril de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo. Después del tratamiento durante 24 h con 0,3 μ M de ouabaína-BODIPY FL[®] verde y del posterior lavado de los cubreobjetos con la solución Krebs Hepes descrita, se incubaron las células con la sonda roja ER-tracker a una concentración 500 nM (Stock 1 mM en DMSO) durante 10 min a 37^a C. Pasado este tiempo se lavaron otra vez los portaobjetos, se montaron en la cámara apropiada y se colocaron en el microscopio para la toma de imágenes secuenciales en el plano Z, cada 1 μ m de espesor, desde el fondo del cubreobjetos hasta el ápice superior de las células. Las imágenes se obtuvieron y analizaron empleando un microscopio confocal Leica SP5 con un objetivo 63x y el software LCS Lite y Leica Application Suite AF 1.8.1 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania), manteniendo una temperatura de 37^a C y un 5% de CO₂.

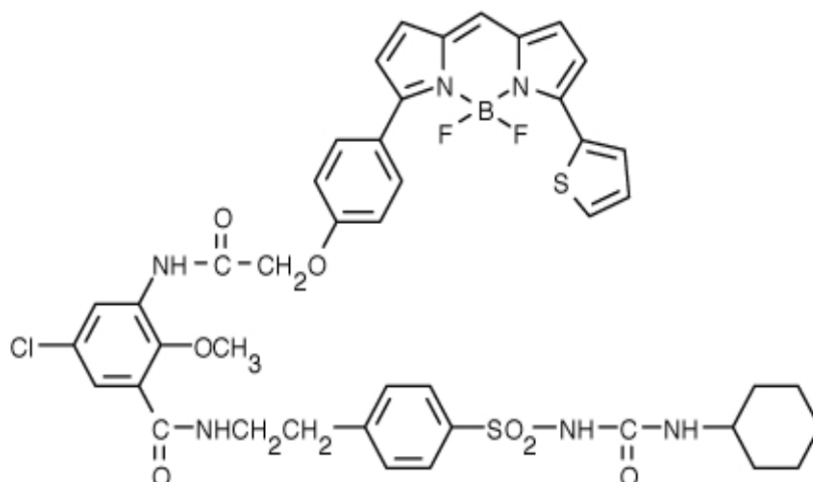


Figura 19. Estructura química de la sonda fluorescente ER-tracker.

2- Para la co-localización con la mitocondria, se empleó el mismo esquema pero ésta vez la sonda empleada fue TMRE de color rojo. El TMRE es una sonda catiónica que atraviesa las membranas celulares y se acumula selectivamente en las mitocondrias; además no es tóxica para las células y es altamente fluorescente. Su captación y equilibrado en esta organela celular es rápido y se consigue en unos pocos minutos.

Las células se sembraron en portaobjetos de vidrio de 22 mm de diámetro colocados en placas de plástico estéril de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo. Después del tratamiento durante 24 h con 0,3 μM de ouabaína-BODIPY FL® verde y del posterior lavado de los cubreobjetos con la solución Krebs Hepes descrita, se incubaron las

MÉTODOS Y MATERIALES

células con la sonda TMRE a una concentración 5 nM (Stock 1 mM en DMSO) durante 5 min y 37^a C. Pasado este tiempo se lavaron nuevamente los portaobjetos con la solución de Krebs Hepes ya descrita, se montaron en la cámara y se colocaron en el microscopio para la toma de imágenes secuenciales en el plano Z como en los casos anteriores.

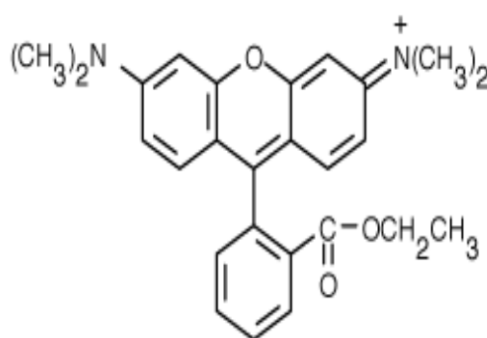


Figura 20. Estructura química de la sonda fluorescente TMRE.

1.2.7. Microscopía de fluorescencia

La fluorescencia es un fenómeno molecular por el que una sustancia absorbe luz de una determinada longitud de onda (equivalente a una determinada energía) y, casi inmediatamente, emite luz de una longitud de onda mayor, esto es, de menor energía. La intensidad y el color de la luz absorbida y emitida son propiedades características de cada molécula fluorescente o fluoróforo. La

MÉTODOS Y MATERIALES

fluorescencia resulta de un proceso que consta de tres etapas: excitación, pérdida de energía y emisión. Durante la etapa de excitación, la molécula absorbe un fotón procedente de una fuente de luz externa y, como consecuencia, pasa desde el estado fundamental a un estado excitado caracterizado por un nivel energético superior (etapa de excitación). Una vez excitada la molécula pasa rápidamente al modo vibracional de menor energía, disipándose energía en forma de calor. Posteriormente, la molécula tiende a pasar de nuevo al estado fundamental emitiendo energía en forma de luz (etapa de emisión). Dado que durante el proceso hay pérdida de energía, la longitud de onda del fotón emitido (λ_{em}) es mayor que aquella del fotón absorbido (λ_{ex}). A esta diferencia en las longitudes de onda se le conoce como desplazamiento de Stokes.

Los fluoróforos son sustancias que, generalmente, presentan estructuras poliaromáticas o heterocíclicas con enlaces o conjuntos de enlaces responsables de la absorción de luz. Cada fluoróforo posee espectros característicos de excitación y de emisión. El espectro de excitación mide la intensidad de luz emitida al ir variando la longitud de onda con la que se ilumina la muestra (λ_{ex}) mientras que el espectro de emisión mide la intensidad de luz emitida a cada longitud de onda (λ_{em}), cuando se fija la longitud de onda con la que se ilumina.

Los elementos requeridos para la detección de fluorescencia son fundamentalmente cuatro. En primer lugar, se requiere una fuente de

luz para provocar la excitación de la muestra. La fuente más adecuada será aquella capaz de emitir luz exclusivamente con la longitud de onda que se requiera, habitualmente la correspondiente a λ_{exmax} (longitud de onda de máxima excitación). Es necesaria, también, la presencia de un fluoróforo, así como de filtros para separar los fotones de emisión de los de excitación y, por último, un detector que capte la luz emitida y la transforme en una señal eléctrica que pueda ser finalmente cuantificada y representada mediante una imagen.

En el microscopio de epifluorescencia la luz incidente, que procede de una potente fuente de luz halógena (lámpara de xenon o de mercurio), accede a la muestra a través del objetivo que actúa como condensador. Inmediatamente antes del objetivo y en el camino óptico dispone de un espejo dicróico que refleja la luz de excitación pero deja pasar la luz emitida. Además, la luz emitida por la muestra (reflejada y fluorescente) ha de atravesar un filtro que selecciona la longitud de onda de emisión del fluorocromo. La luz procedente de la fuente (lámpara de mercurio o xenón), atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda capaz de excitar al fluorocromo, antes de incidir sobre la muestra. Esta luz se refleja en un espejo dicromático (o dicroico) e incide sobre la muestra, excitando al fluorocromo, el que emite fotones de una longitud de onda mayor que la incidente. La luz emitida por la muestra no se refleja sino que atraviesa el espejo dicroico y llega a un segundo filtro que selecciona la longitud de onda de

emisión del fluorocromo. Finalmente, la luz ingresa a un fotomultiplicador que la convierte en una señal eléctrica.

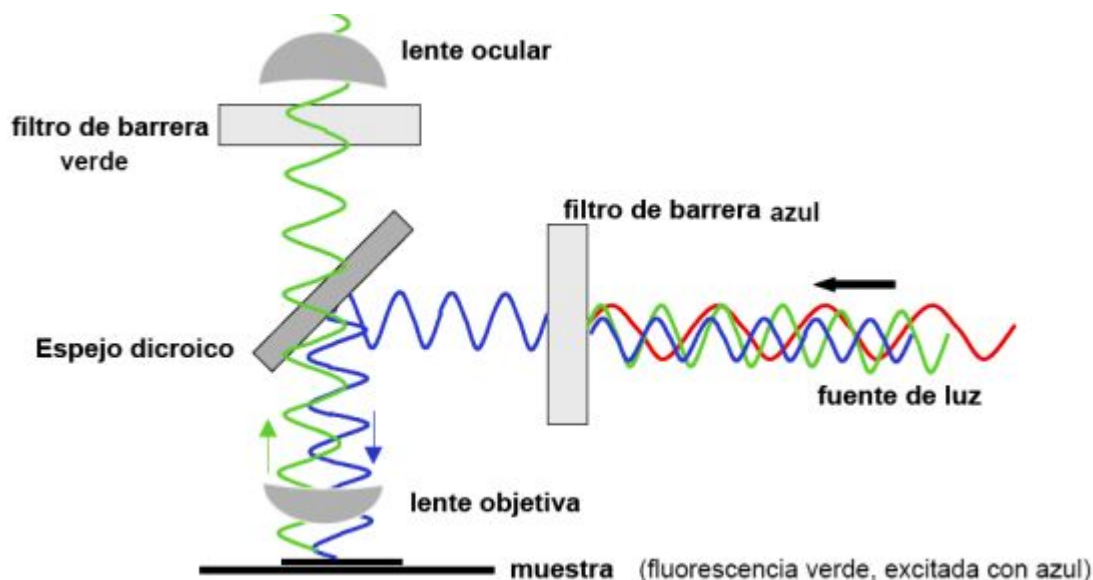


Figura 21. Esquema de un microscopio de epifluorescencia.

1.2.7.1. Morfología y distribución mitocondrial. Potencial de membrana mitocondrial

Como ya hemos mencionado anteriormente, una organela celular fundamental en los procesos apoptóticos es la mitocondria. En situaciones patológicas, la función mitocondrial se altera, mediada por la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. La consecuente caída en los niveles de ATP y la apertura del poro de transición

MÉTODOS Y MATERIALES

mitocondrial favorece la liberación al citoplasma de partículas pro-apoptóticas como el citocromo c. Una vez en el citoplasma, éste se une al factor activador de la apoptosis (Apaf-1) formando el apoptosoma (Cain y col., 1999), esencial para la activación de la caspasa-9, iniciadora de la apoptosis mediante la vía intrínseca (Lindsey y col., 2009).

Con el fin de estudiar las posibles alteraciones del potencial mitocondrial, se empleó una sonda fluorescente verde conocida como Green MitoTracker. Ésta sonda permeable entra en la célula por difusión pasiva y se acumula en las mitocondrias activas de forma muy selectiva. Presenta numerosas ventajas respecto de otras sondas mitocondriales: en solución acuosa no tiene fluorescencia, sólo fluoresce cuando se acumula en los lípidos de las mitocondrias, por lo que no hay una señal de fondo que contamine la señal de nuestra muestra. Además, presenta la ventaja de que puede emplearse incluso en células que han sido previamente fijadas y es mucho más fotoestable y selectiva a bajas concentraciones que otras sondas. Como inconveniente está el hecho de que no es retenida por células permeabilizadas.

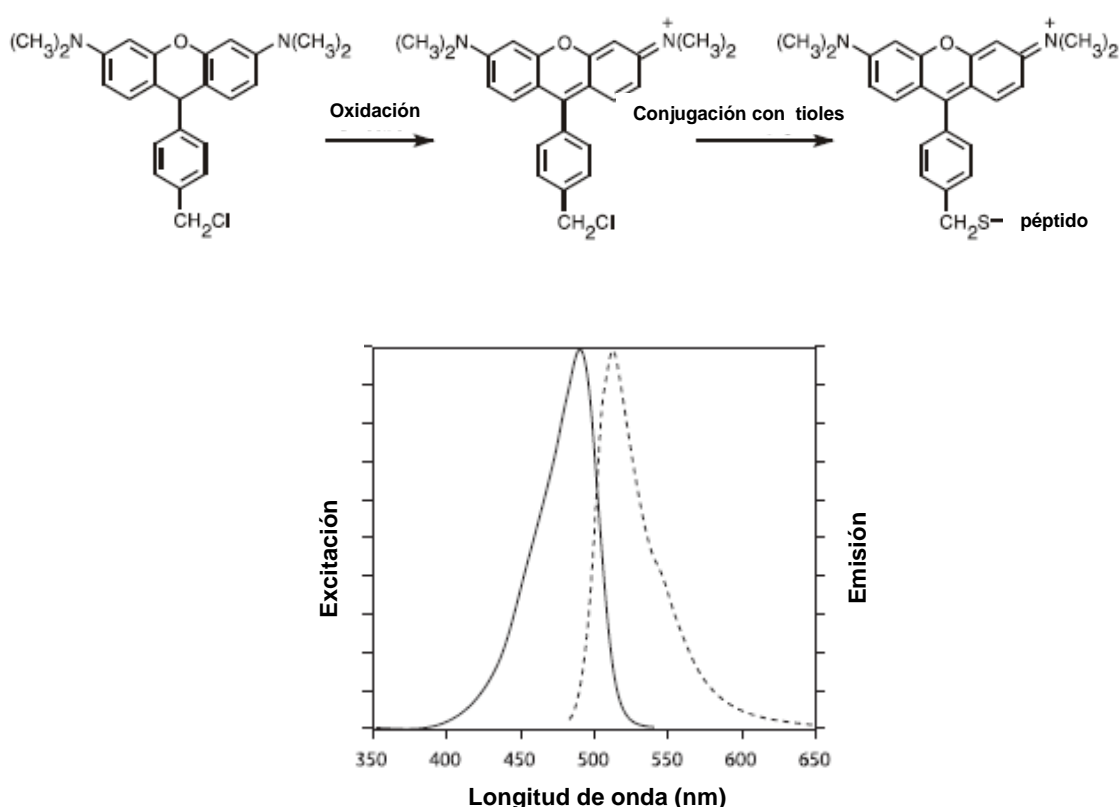


Figura 22. Estructura química de la sonda Green MitoTracker. La sonda entra en las mitocondrias de las células vivas y reacciona con los grupos tioles de las proteínas. Espectro de excitación/emisión de la sonda.

Para esta determinación se sembraron las células sobre portaobjetos de vidrio de 18 mm de diámetro colocados en placas transparentes de plástico estéril de seis pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo. Posteriormente se incubaron con la sonda Green MitoTracker a una concentración de 100 nM durante 10 min a temperatura ambiente (Stock 1 mM en DMSO). Algunos cubres se emplearon como controles, quedando exentos de tratamiento. Los

tratamientos con ouabaína a 0,3 μ M se realizaron a distintos tiempos (1 y 3 h) basándonos en los resultados de activación de caspasas y contenido celular de ATP obtenidos previamente. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia con un objetivo de 60 aumentos y se analizaron con el software CellR versión 2.6 (Olympus).

1.2.8. Determinación del citocromo c

El citocromo c es una proteína pequeña, que funciona como transportador electrónico mitocondrial entre los complejos respiratorios III y IV. Se trata de una proteína monomérica, es decir un solo polipéptido unido a un grupo prostético constituido por un hemo C, con un ión de hierro coordinado. El grupo prostético porfirínico está unido a la proteína covalentemente a través de dos cisteínas y queda inmerso en el interior de la estructura, en un entorno hidrofóbico. El citocromo c se encuentra situado en las mitocondrias de la mayoría de células eucariotas, en la membrana mitocondrial interna.

Tras la exposición a un tóxico, la activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c. Una vez en el citosol, activa un complejo proteico llamado apoptosoma, que activa directamente a la caspasa-9. Una vez que la caspasa-9 está

MÉTODOS Y MATERIALES

activada, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3 y la caspasa-7, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis.

Por su importante implicación en el proceso apoptótico, decidimos determinar los niveles de citocromo c en células expuestas al digitálico y ver si presentaban diferencias con respecto a las células control. Para ello empleamos la técnica de la inmunofluorescencia.

Para estos experimentos se sembraron las células sobre portaobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro colocados en placas transparentes de plástico estéril de veinticuatro pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/pocillo. Pasadas 24 h se trataron con 0,3 μ M de ouabaína durante 4 h y se procedió a realizar la inmunofluorescencia. Algunos cubres se emplearon como controles, quedando exentos de tratamiento. Se lavaron los cubres con PBS a 37° C y se fijaron las células con paraformaldehído (1%) a 37° C durante 30 min. Posteriormente se lavaron 3 veces más y se dejaron a 4° C de 18 a 24 h. Tras permeabilizarlas con tritón (0,1%) y lavarlas 3 veces con PBS, se bloquearon con el reactivo "Image-IT FX signal enhancer" durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron nuevamente las células con PBS y se procedió a su incubación a temperatura ambiente con el anticuerpo primario anti-citocromo c (1:100) disuelto en PBS-BSA durante 45 min. Posteriormente se lavaron y se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario Alexa (1.1000) durante 45 min. Para finalizar, se tiñeron los núcleos con DAPI (1:1000) durante 10 min, se

lavaron los portaobjetos con PBS y se montaron con líquido específico para montaje. Las muestras se conservaron a 4° C. La toma de imágenes se realizó con un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) y para su análisis empleamos el software Image J versión 1.45.

1.2.9. Medidas de calcio citosólico con Fura-2AM

El Fura-2 acetoximetil éster (Fura-2AM) es un derivado permeable de la sonda ratiométrica para calcio (Ca^{2+}) Fura-2 que permite realizar medidas de su concentración citosólica ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) mediante fluorescencia. Cuando se añade a las células atraviesa la membrana celular y, una vez dentro de la célula, los grupos acetoximetil éster se eliminan por la esterasas celulares, generando Fura-2 libre, que no puede escapar de la célula (Pozzan y Tsien, 1988).

Las medidas de fluorescencia a 340 y 380 nm permiten calcular la concentración intracelular de Ca^{2+} en función de la razón 340/380. El hecho de emplear la razón, permite eliminar errores resultado de diferencias en la concentración de Fura-2 en las distintas zonas de la muestra o del grosor de la célula empleada, que de otro modo conducirían a artefactos.

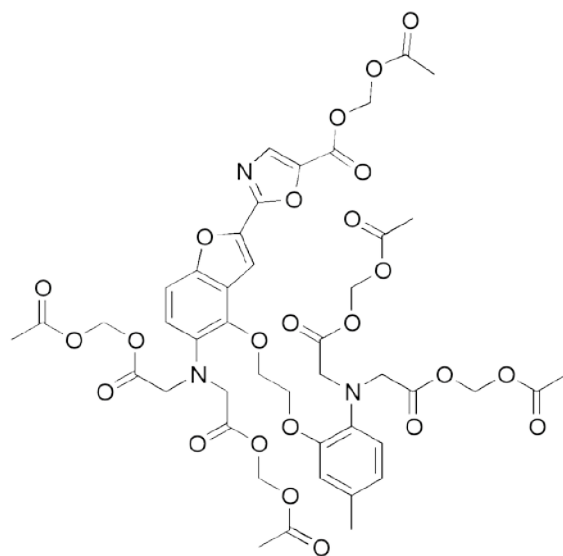


Figura 23. Estructura química de la sonda Fura2-AM.

Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro colocados sobre placas de plástico estéril de 24 pocillos a una densidad de 2×10^4 células/pocillo. Se trataron con ouabaina 0,03 y 0,3 μM durante 6 h (tiempo en el que se activan las caspasas-3/7 y -9) y 24 h (tiempo al que se estudió la apoptosis). Pasado éste tiempo, se cargaban las células con la sonda Fura-2AM (2,5 μM), ácido plurónico (5 μM) y probenecid (1 mM), durante 45 min a 37°C y oscuridad en una solución de Krebs HEPES pH 7,4 que contenía (en mM) 145 NaCl, 5,9 KCl, 1,2 MgCl_2 , 2 CaCl_2 , 10 D-glucosa, 10 HEPES. Posteriormente se dejaban a temperatura ambiente durante los 15 min previos a su montaje en una cámara que contenía la solución Krebs HEPES mencionada, modelo JG-23W/LP, acoplada al microscopio de fluorescencia (BX51WIF, Olympus)

MÉTODOS Y MATERIALES

con objetivo de inmersión en agua (LUMPlanFI 60X/0.90 W; Olympus, Japón). Se dieron pulsos de histamina a 100 μ M durante 30 s para valorar la respuesta de las células. Se realizaron medidas de la $[Ca^{2+}]_c$ a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ C$), intensidad del 3,42%, y objetivo 40X empleando las longitudes de onda de excitación apropiadas, 340 (filtro 340AF15EX 548-0410) y 380 nm (filtro 380AF15EX 547-0411) y emisión a 505 nm (U_M2FUR). El intercambio de los filtros se realizaba automáticamente a través del programa informático CellR versión 2.6 (Olympus). Tanto los filtros como el espejo dicróico fueron adquiridos a Olympus, Japón. La sincronización de la rueda de los filtros (440DF20), la cámara CCD (Sony) acoplada al microscopio y el análisis de imagen se realizó a través del programa CellR versión 2.6 (Olympus). La solución llegaba a la cámara y se intercambiaba a través de una bomba peristáltica. Los cambios en la fluorescencia debidos a los cambios de Ca^{2+} se calculaban como la razón 340/380 de la luz emitida cuando la sonda se excitaba por las dos longitudes de onda alternativamente. Los datos se normalizaron con la media de los valores de las diez imágenes que precedían a la aplicación del estímulo.

1.3. Análisis estadístico

Los datos estadísticos se muestran como la media de los valores \pm media del error estándar (S.E.M.) para cada grupo de experimentos. El análisis estadístico y la significación estadística entre los distintos tratamientos se evaluó empleando el programa de bioestadística SPSS versión 16.0 para el análisis de la varianza (ANOVA), para comparaciones múltiples (Bonferroni post hoc test) asumiendo varianza igual y dos colas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

2. Materiales

- El medio de cultivo DMEM con alta concentración de glucosa, los antibióticos penicilina/estreptomicina, el suero bovino fetal y la L-glutamina se compraron a GIBCO-Invitrogen (Madrid, España).

- La ouabaína, el yoduro de propidio, la ribonucleasa A, el tritón y el reactivo de MTT se compraron a Sigma Aldrich (España).

- Los compuestos mencionados en el punto 5 del capítulo "Resultados", se adquirieron en Molecular Probes-Invitrogen (Madrid, España), salvo el Z-LEHD-FMK que se compró a Biogen (Madrid, España) y el ITH33122/IQM 9,21. Este compuesto se sintetizó en el Instituto Teófilo Hernando (ITH) de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM)/Instituto de Química Médica del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

- Los kits para la determinación de caspasas-3 y -7 (Caspase-Glo (R) 3/7 Assay), caspasa-8 (Caspase-Glo (R) 8 Assay), caspasa-9 (Caspase-Glo (R) 9 Assay) y ATP (CellTiter-Glo Luminiscent Cell Viability Assay) se compraron a Promega Biotech Ibérica S.L. (Madrid, España).

- La ouabaína-BODIPY FL las sondas TMRE, ER-Tracker Red, Green MitoTracker y Fura-2AM, el reactivo Image-IT FX signal enhancer, y el kit

MÉTODOS Y MATERIALES

Alexa 488 verde se compraron a Molecular Probes-Invitrogen (Madrid, España).

- El anticuerpo Purified Mouse Anti-Cytochrome c, clon 6H2.B4, se compró a BD Pharmingen (España).

IV. Resultados

1. Efectos del digitalico ouabaína sobre la morfología de las células HeLa

Las células HeLa son células poligonales de gran tamaño, adherentes, con crecimiento en monocapa, que derivan de un carcinoma epitelial de cérvix. Con el objetivo de estudiar posibles cambios morfológicos que la incubación con el digitalico ouabaína pudiera causarles, tomamos fotografías de las células a distintos tiempos de exposición (2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 h) empleando concentraciones crecientes (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 y 100 μ M) del digitalico.

La **figura 24** muestra fotografías de células HeLa. El panel 1A (*control*) corresponde a unas células que no han sido sometidas a ningún tratamiento. Se aprecia la morfología poligonal característica de estas células que han alcanzado la confluencia. Crecen uniformemente con pequeñas prolongaciones, adheridas y en monocapa en el fondo del pocillo. Están poco vacuolizadas y poseen una membrana birrefringente. Las fotografías sucesivas, B, C, D, E y F, corresponden a células tratadas con concentraciones crecientes de ouabaína (0,03, 0,1, 0,3, 1 y 3 μ M) durante 24 h. Podemos observar que a medida que la concentración del digitalico aumenta, la morfología de las células también varía, tornando a otra más redondeada; además muchas células están despegadas del fondo del pocillo. Además se aprecia un notable descenso en la densidad celular con respecto a la

RESULTADOS

que presentan las células control. Se aprecia una menor proliferación celular en presencia de ouabaína, no llegando a alcanzar la confluencia.

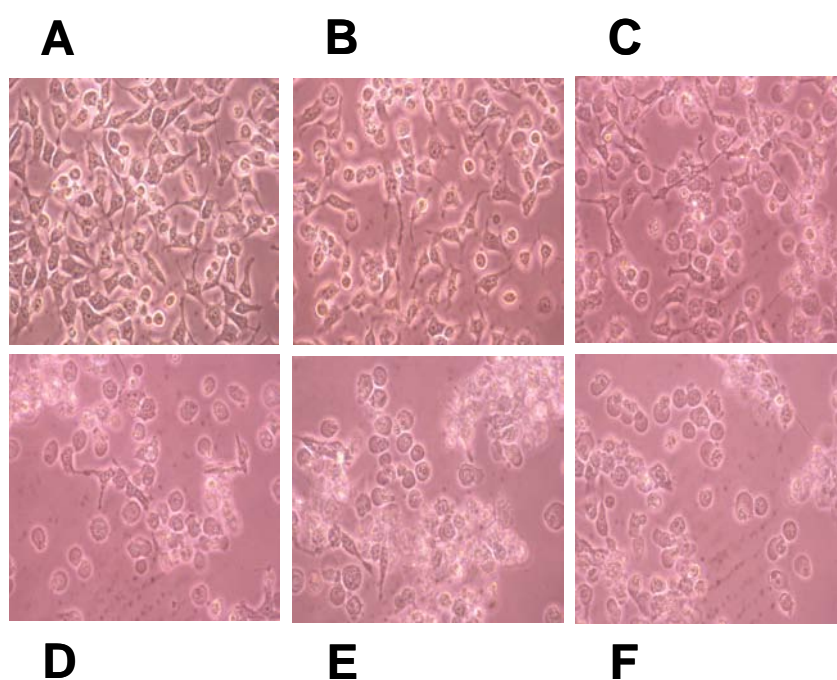


Figura 24. Imagen de microscopía óptica (20X) de un cultivo representativo de células **HeLa**. Las células control (A) presentan una morfología poligonal característica con pequeñas prolongaciones. Crecen hasta confluencia en monocapa adheridas al fondo del pocillo. Concentraciones crecientes de ouabaina (desde 0,03 μM hasta 3 μM) (B, C, D, E y F) durante 24 h, van modificando paulatinamente dicha morfología hacia otra más redondeada y despegada del fondo del pocillo. Además, la proliferación y densidad celular disminuyen notablemente tras la exposición al digitalico.

Para profundizar en estos primeros resultados que mostraban algunos cambios morfológicos provocados por el digitalico, empleamos

RESULTADOS

una ouabaína marcada fluorescente de color verde conocida como ouabaína-BODIPY FL. Este derivado fluorescente nos permite rastrear la localización de ouabaína en la célula.

La **figura 25** muestra fotografías de células HeLa tomadas con microscopía confocal. Las imágenes A1 y A2 corresponden con células control que no han sido sometidas a tratamiento alguno. El panel A1, campo claro, muestra la morfología poligonal y adherente típica de estas células ya descrita con anterioridad. El panel A2 corresponde con una imagen confocal de las mismas células control en la que no se observa que presenten autofluorescencia alguna. Las imágenes B1 y B2 corresponden a células que han sido tratadas durante 24 h con 0,3 μM de ouabaína-BODIPY FL. El panel B1 (campo claro) muestra que tras la incubación con el compuesto, las células han cambiado su morfología típica por una más redondeada y vacuolizada y han perdido la adherencia al fondo del pocillo. La imagen B2 (campo confocal) muestra las mismas células además de redondeadas y vacuolizadas con un intenso color verde, correspondiente al digitálico en el interior celular y alrededor de la membrana plasmática fundamentalmente.

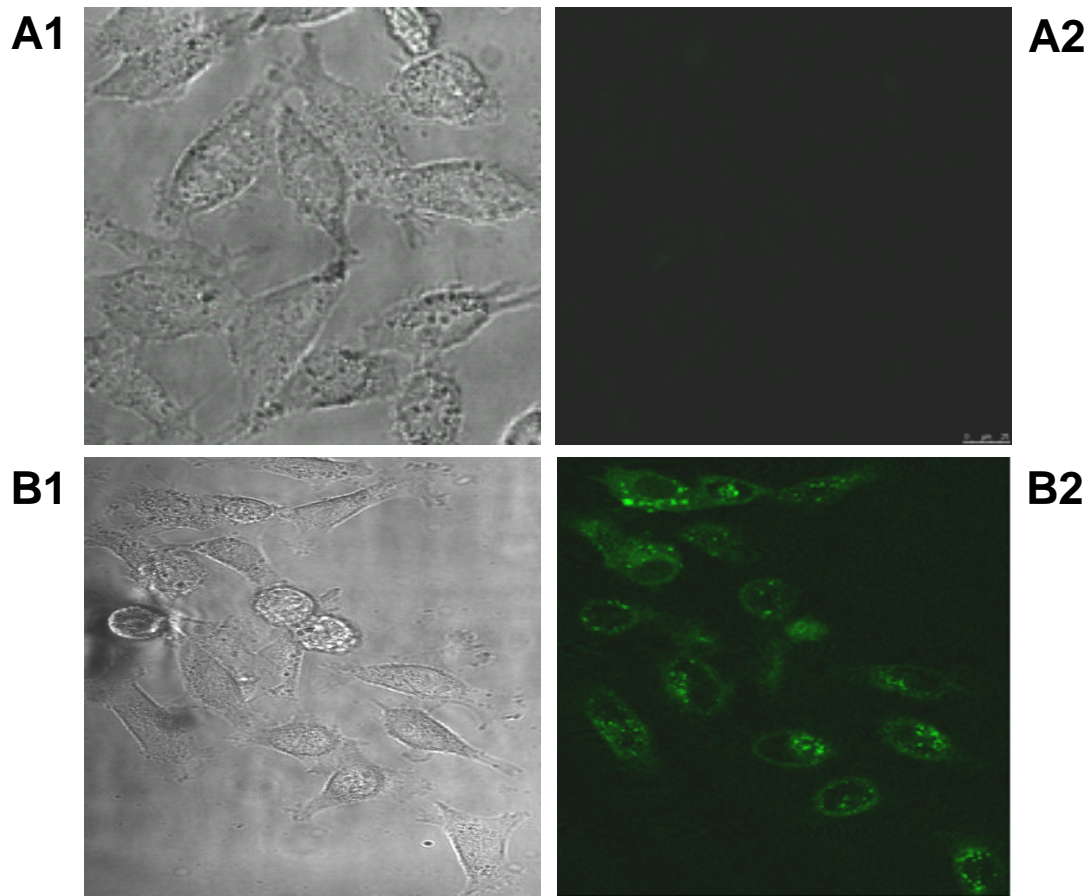


Figura 25. Microfotografías de microscopía confocal de células HeLa. Las células controles (basal) (A), en la imagen de campo claro (A1), muestran su morfología típica y no presentan autofluorescencia cuando las vemos con microscopía confocal (A2). Las células tratadas con ouabaína fluorescente verde (ouabaína-BODIPY FL) 0,3 μM durante 24 h (B) en la imagen de campo claro (B1) presentan un aspecto más redondeado, vacuolizado y han perdido la adherencia al fondo del pocillo. La microscopía confocal (B2) muestra que las mismas células han captado la ouabaina-BODIPY FL de color verde.

2. Efectos de la ouabaína en el ciclo celular

La determinación del contenido de ADN permite conocer la distribución de las células de una población en cada fase del ciclo celular. Tras la tinción de las células con yoduro de propidio, se seleccionó nuestra línea celular en función de su tamaño y complejidad, eliminando los dobletes y restos de asociaciones celulares. En las partículas individuales se cuantificó la intensidad de la fluorescencia del yoduro de propidio por área, para estimar la cantidad de ADN de cada célula.

En un ciclo típico de células HeLa en situación control, puede verse una población mayoritaria en la fase G0/G1 del ciclo celular, otra correspondiente a la fase G2/M, cuyo pico de fluorescencia es aproximadamente el doble que el de la fase G0/G1 y entre ambas poblaciones se distribuyen la células que se encuentran en la fase de síntesis (S) (**Figura 26**). Apenas se aprecian células con contenido hipodiploide en esta situación (<5%).

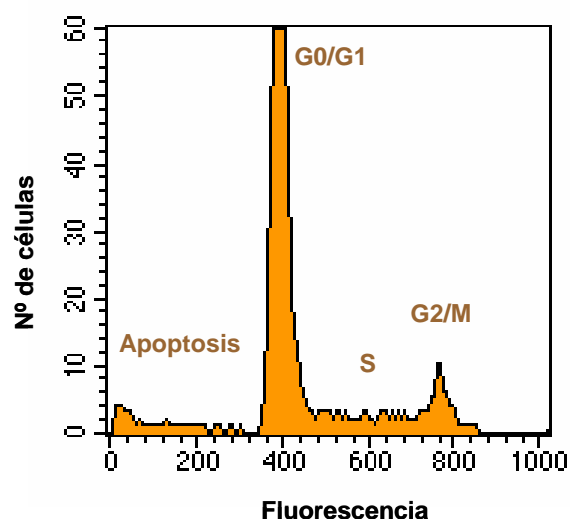


Figura 26. Registro original obtenido con el citómetro de flujo. Se representa el número de células (eje y) que muestran una determinada intensidad de fluorescencia (eje x, fluorescencia del yoduro de propidio).

2.1. Apoptosis en células HeLa

La muerte celular apoptótica puede detectarse analizando el contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular. Las células apoptóticas tienen un contenido hipodiploide de ADN (Nicoletti y col., 1991; Robinson y col., 1997).

En la **figura 27** se comparan dos registros originales obtenidos al analizar el contenido de ADN en las células HeLa. El panel A corresponde a la situación control. En ésta figura se observa el ciclo celular típico descrito en el apartado anterior. Sólo un 4,65% de todas las células analizadas (5000 células) muestran contenido hipodiploide de

RESULTADOS

ADN y se encuentran por lo tanto en apoptosis. El panel B representa un registro de un cultivo expuesto a 0,3 μ M de ouabaína durante 24 h; la población que presenta un contenido hipodiploide de ADN (51,76%) es significativamente superior que la encontrada en condiciones basales.

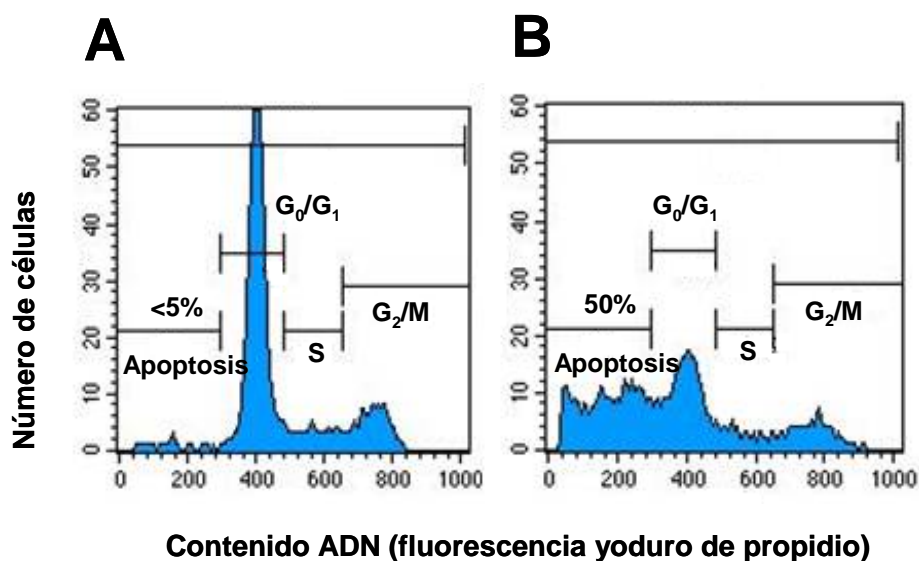


Figura 27. Distribución del contenido de ADN en células HeLa. Situación control (A) y tratadas con 0,3 μ M de ouabaína durante 24 h (B). En ordenadas se representa el número de células y en abscisas la señal de fluorescencia asociada al yoduro de propidio. Obsérvese el incremento de células apoptóticas (<5% en el panel A) inducido por ouabaina (50%, en el panel B).

2.2. Efectos del empleo de concentraciones crecientes de ouabaína, durante distintos tiempos, en la apoptosis celular

Con el fin de establecer un perfil de toxicidad de la ouabaína en las células HeLa, se realizó una curva dosis-respuesta. Para ello se incubaron las células con concentraciones crecientes del digitálico (0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 y 100 μM) empleando además distintos tiempos de exposición (2, 6, 12, 24 y 48 h).

En la **figura 28** podemos apreciar que las concentraciones submicromolares de ouabaína (0,03, 0,1, 0,3, 1 y 3 μM), incubadas durante 24 h, inducen apoptosis de las células HeLa. Con 0,03 μM del digitálico se produce una apoptosis superior (14,98%) a la encontrada en condiciones basales (<5%). Con 0,3 μM de ouabaína se alcanza un valor máximo de apoptosis que hemos cuantificado en un 51,76%. La estaurosporina, control positivo de apoptosis por ser un inhibidor de proteíncinasas, a las dos concentraciones empleadas de 0,3 y 1 μM durante 5 h, induce una apoptosis significativamente superior (80,24% y 83,5% respectivamente) a la observada en las células en condiciones control (n=10).

Concentraciones superiores a 3 μM , (10 y 100 μM), durante 24 h no aumentaron el efecto apoptótico del digitálico en nuestro modelo celular.

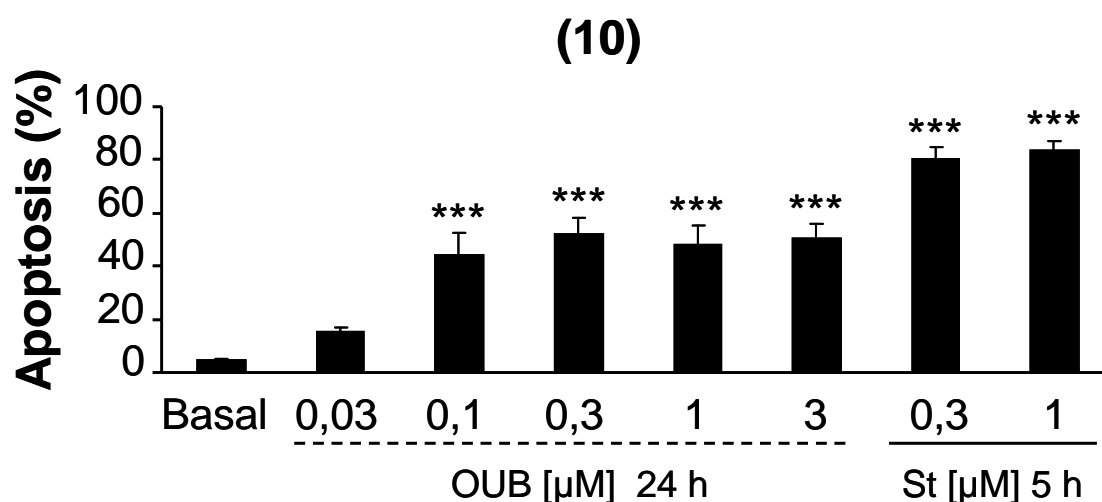


Figura 28. Curva dosis-respuesta de ouabaína (OUB) 24 h. En la ordenada se expresa en porcentaje el efecto apoptótico de la OUB y en la abscisa las diferentes concentraciones empleadas. Como control positivo de apoptosis se emplea estaurosporina (St) a 0,3 y 1 μ M durante 5 h, alcanzando un valor aproximado del 83% respecto al control o basal (<5%). Se aprecia un salto notable en los valores de apoptosis entre las concentraciones de 0,03 μ M (14,98%) y 0,1 μ M (44,3%) de OUB, alcanzándose un valor máximo con 0,3 μ M de OUB (51,76%), que no se incrementa con las concentraciones mayores del digitálico. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 10 experimentos realizados en tres cultivos diferentes. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

La exposición a 0,3 μ M de ouabaína, concentración a la que se alcanza el valor máximo de apoptosis a las 24 h, durante tiempos más cortos (1, 2, 6 y 12 h), produjeron unos valores de apoptosis similares a los basales que en todos los casos rondaron el 6% (n=4) (**Figura 29**).

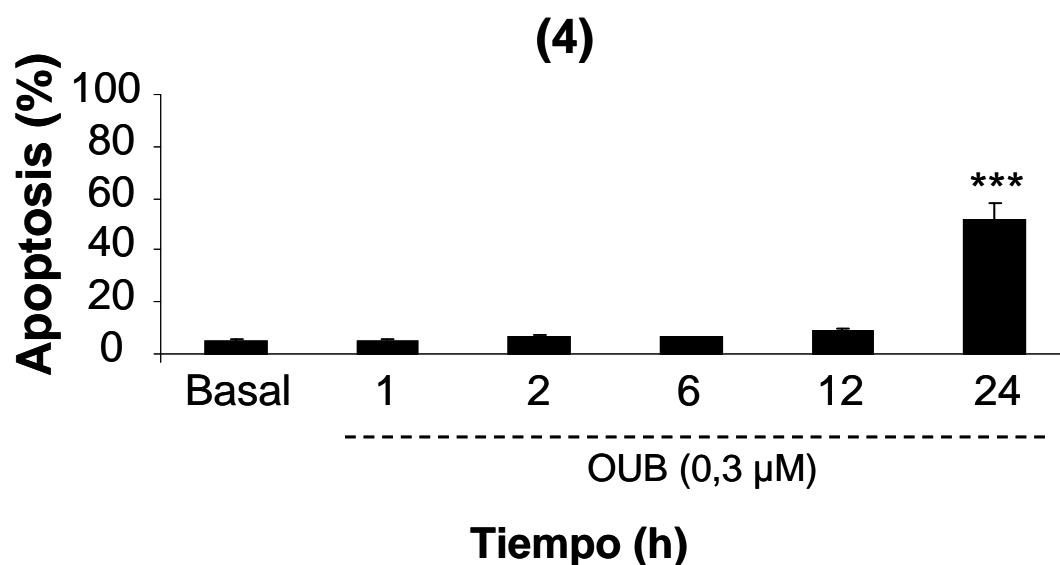


Figura 29. Curva temporal de ouabaína (OUB) 0,3 μ M. En la ordenada se expresa en porcentaje el efecto apoptótico de la OUB y en la abscisa los diferentes tiempos de exposición empleados. Para todos los tiempos, los valores de apoptosis son similares (del 4,7 % al 8,7%) y no presentan diferencias con respecto a los controles o basales (<5%). Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos realizados en tres cultivos diferentes. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

Un mayor tiempo de exposición al digitálico ampliado hasta las 48 h tampoco aumenta la toxicidad con respecto a la observada a las 24 h. En este caso el valor máximo de apoptosis se alcanza con la concentración de 0,1 μ M de ouabaína (45,3%) y es significativamente superior a la encontrada en condiciones basales (8,87%) (n=3) (**Figura 30**).

RESULTADOS

Concentraciones mayores del digitálico (0,3, 1 y 3 μM) tampoco incrementan la apoptosis en este caso.

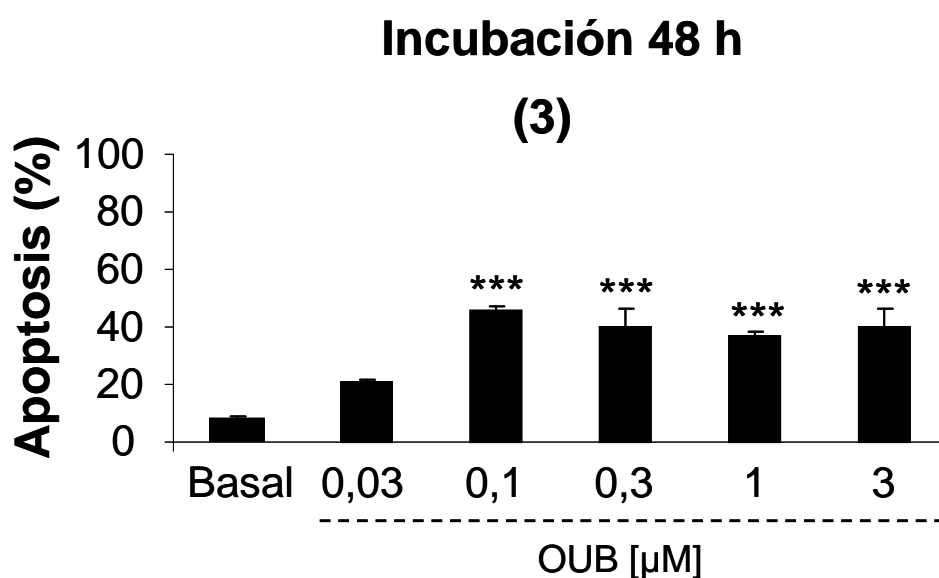


Figura 30. Curva dosis-respuesta de ouabaína (OUB) 48 h. En la ordenada se expresa en porcentaje el efecto apoptótico de la OUB y en la abscisa las diferentes concentraciones empleadas. Con 0,03 μM de OUB el valor de apoptosis es del 20,6% y con la concentración de 0,1 μM ya se alcanza un valor de apoptosis máximo (45,4%) que es significativamente superior al basal (8,87%). Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos realizados en tres cultivos diferentes. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

El empleo de concentraciones mayores del digitálico (10 y 100 μM) o mayores tiempos de incubación (llegando hasta las 48 h) no

incrementaron los valores de apoptosis inducida por ouabaína, que en todos los casos fueron próximos al 45 %.

3. Unión de la ouabaína a la bomba Na^+/K^+ ATPasa

Está bien establecido que el digitálico digoxina ejerce su acción a través de su unión a la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática, provocando un incremento del Na^+ y del Ca^{2+} intracelular. Para comprobar si la ouabaína se unía también a la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana de las células HeLa, hicimos incubaciones de 24 h con ambos digitálicos. Por separado, para comparar sus efectos tóxicos *per se* en nuestro modelo, y juntos, con el fin de comprobar si existe o no un efecto aditivo en la apoptosis producida. De ser afirmativa esta última hipótesis, podríamos inferir que ambos digitálicos actúan por vías diferentes, contribuyendo ambas a la apoptosis producida en las células HeLa, sumándose los efectos de ambos. Si la apoptosis observada tras la co-incubación de ambos digitálicos fuera igual que la obtenida con ambos por separado, entonces podríamos afirmar que los dos están actuando a través de la misma vía, es decir, uniéndose a la bomba Na^+/K^+ de la membrana plasmática.

La **figura 31** muestra que tras la incubación durante 24 h con ambos digitálicos por separado (0,3, 1 y 3 μM de digoxina y 0,3 μM de

RESULTADOS

ouabaína), la apoptosis producida en las células HeLa es similar en todos los casos (38,2, 38,9 y 38,4% para las concentraciones respectivas de 0,3, 1 y 3 μM de digoxina y 37% para la ouabaína) y significativamente superior a la basal (<5%). Además cuando se preincuba la digoxina durante 24 h y se co-incuba con 0,3 μM de ouabaína durante 24 h adicionales, no hay aditividad en el efecto apoptótico (42, 43,6 y 44%) con respecto a los valores de ambos digitálicos por separado. En todos los casos los datos de apoptosis tras la incubación con los digitálicos juntos o separados fueron mayores que los de las células control (<5%) (n=6).

Estos resultados indican que tanto la digoxina como la ouabaína se están uniendo a la bomba Na^+/K^+ ATPasa. La ausencia de aditividad en el efecto apoptótico cuando se co-incubaban apunta a que además ambos comparten el sitio de unión en la bomba.

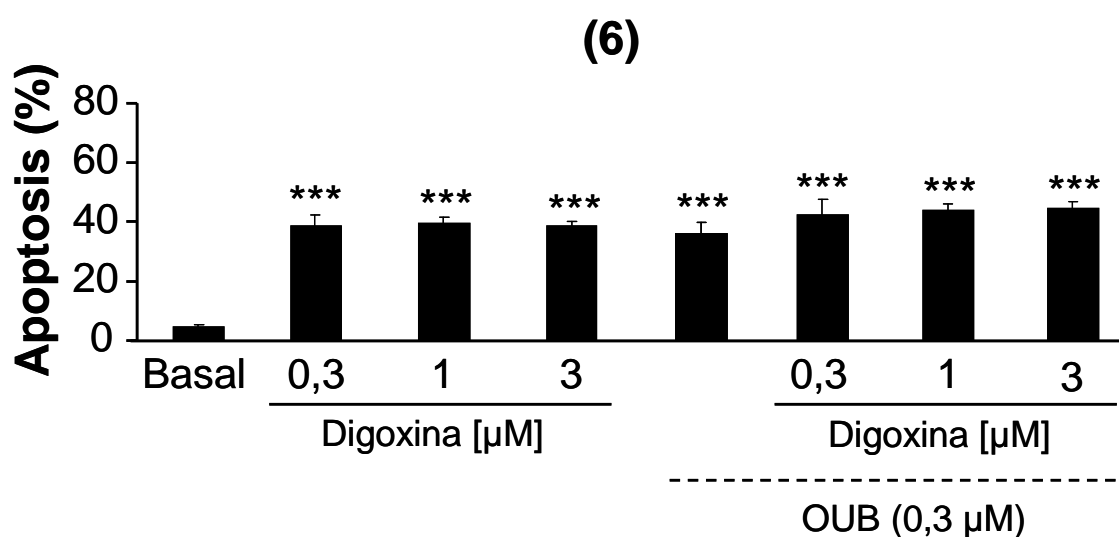


Figura 31. Efecto apoptótico de la digoxina, sola o combinada con ouabaína (OUB), en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las distintas concentraciones empleadas. La co-incubación de ambos digitálicos no incrementa la apoptosis con respecto a la de cada uno por separado. En todos los casos los valores de apoptosis son muy similares entre sí (entre el 38 y el 44%) y significativamente superiores al basal (<5%). Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 6 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

4. Efectos de la ouabaína sobre la viabilidad celular

Nuestros datos preliminares ponen de manifiesto la inducción de una lesión celular, traducido en apoptosis, cuando se incuban las células HeLa durante 24 h con concentraciones crecientes de ouabaína (0,03 hasta 100 μ M). Para aportar más evidencias de este daño celular,

RESULTADOS

hicimos estudios de viabilidad celular empleando la técnica conocida como MTT.

Tras la incubación durante 24 h con concentraciones crecientes del digitálico (0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, y 10 μM), la viabilidad celular y la capacidad de las reductasas mitocondriales para transformar la sal de MTT en una sal de formazán coloreada y soluble, disminuyen (un 20, 26, 26,4, 23,6 y 25,4% para las respectivas concentraciones del digitálico) de forma significativa con respecto al control o basal (considerada el 100% ya que se trata de células exentas de tratamiento)(n=8). Estos datos que se reflejan la **figura 32**. Sólo la concentración de 0,03 μM de ouabaina parece incrementar, aunque de manera muy ligera con respecto a la basal, la viabilidad celular. Este dato podría explicarse por una mayor proliferación de las células en estos pocillos.

Los resultados de viabilidad celular y funcionalidad mitocondrial recogidos en este apartado se correlacionan muy bien con los datos de apoptosis descritos previamente. De ellos se deduce que la exposición al digitálico provoca un daño celular que disminuye la funcionalidad mitocondrial, comprometiendo así la viabilidad de estas células.

RESULTADOS

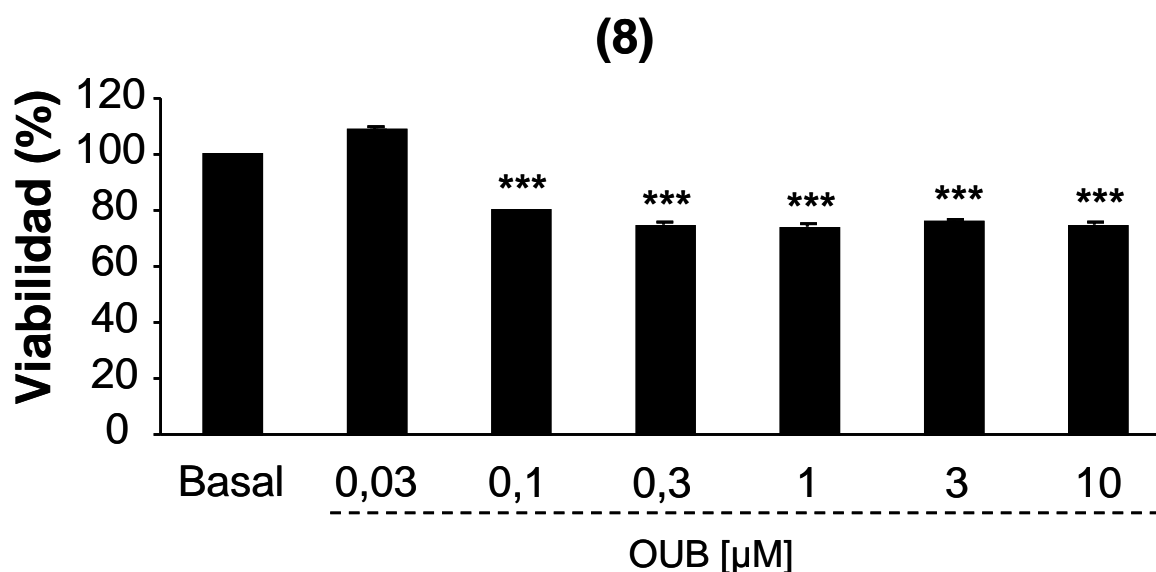


Figura 32. Efectos de la ouabaína (OUB) sobre la viabilidad de las células HeLa medida con MTT. En la ordenada se representa el porcentaje de viabilidad, asignando el valor de 100% a las células control (basal), y en la abscisa las distintas concentraciones del digitálico empleadas. Concentraciones de OUB iguales o superiores a 0,1 µM disminuyen significativamente la viabilidad celular (en torno al 25% según la concentración de OUB empleada) con respecto a la de las células control (basal) considerada del 100%. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

Con el fin de esclarecer un posible mecanismo por el cual la exposición a ouabaína resultaba tóxica para las células HeLa, decidimos manipular diversas dianas celulares, tradicionalmente relacionadas con la apoptosis, empleando diferentes herramientas farmacológicas a nuestro alcance.

5. Manipulación de dianas celulares con diversas estrategias farmacológicas ligadas a la apoptosis

Apoyándonos en los resultados iniciales, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el papel de distintas organelas celulares en la toxicidad a ouabaína. Para ello manipulamos las concentraciones en el medio celular de los iones Na^+ y K^+ (por su implicación en el funcionamiento de la bomba) y del ión Ca^{2+} por su papel relevante en los procesos de toxicidad celular. También estudiamos el posible efecto protector frente a la toxicidad del digitálico, de distintos compuestos con reconocidas propiedades neuroprotectoras.

Uno de los mecanismos clásicos de toxicidad celular es el que tiene lugar debido a una sobrecarga de Ca^{2+} . Ésta sobrecarga tóxica de Ca^{2+} se ha observado en numerosos modelos celulares en los que la unión del digitálico a la bomba Na^+/K^+ de la membrana plasmática produce un desbalance en la concentración intracelular de estos iones. Este cambio en la concentración iónica pone en funcionamiento en forma reversa al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática lo que conduce a la muerte de las células expuestas debido a un exceso en la concentración intracelular de Ca^{2+} (McConkey y col., 2000, Olej y col., 1998, Yeh y col., 2001). Sin embargo, hay que descartar que la toxicidad ouabaínica observada en las células HeLa pueda explicarse por éste

mecanismo, ya que carecen del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (Liu y col., 2000, Furman y col., 1995).

5.1. Manipulación del flujo iónico

Nuestra primera aproximación consistió en modificar la concentración de los iones que directamente guardan relación con la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática. Los resultados se recogen en la **figura 33**.

El ión K^+ , empleado en clínica para tratar la intoxicación digitálica ya que consigue desplazar a estos fármacos de su unión a la bomba, no consiguió disminuir la toxicidad ouabaínica cuando se añadía al medio celular un exceso de 20 mM de éste ión durante 24 h. La apoptosis producida en este caso fue del 52,2% y no resultó significativamente mayor que la de la ouabaína sola. Este exceso de K^+ en el medio tampoco resultó tóxico *per se* tras 24 h, mostrando las células un valor de apoptosis del 3,75%, similar al basal (n= 6).

Por otra parte, 50 mM de exceso de Na^+ en el medio durante 24 h no sólo no disminuyó la apoptosis producida por el digitálico si no que la aumentó un 35% con respecto a la ouabaína sola, alcanzando este dato la significación estadística. El exceso de este ión en el medio produjo una apoptosis *per se* del 5%, similar a la observada en las

RESULTADOS

células control (basal) ($n = 11$). Este incremento de la toxicidad por exceso de Na^+ podría guardar relación con una elevación de la osmolaridad del medio, motivo por el que empleamos su equivalente molar de N-metil-D-glutamina (NMDG, $100 \mu\text{M}$).

Como en el caso del Na^+ , el resultado con NMDG fue también un incremento del 55% en el valor de la apoptosis con respecto a la del digitálico sólo en incubaciones de 24 h. En este caso, este compuesto *per se* mostró una toxicidad del 31,44%, significativamente superior a la basal (<5%) ($n = 5$).

Estos resultados muestran que el incremento de la toxicidad observada cuando se añaden 50 mM de Na^+ al medio celular, con respecto a la que produce la ouabaína sola, se debe a un cambio en la osmolaridad del mismo y no a otra causa.

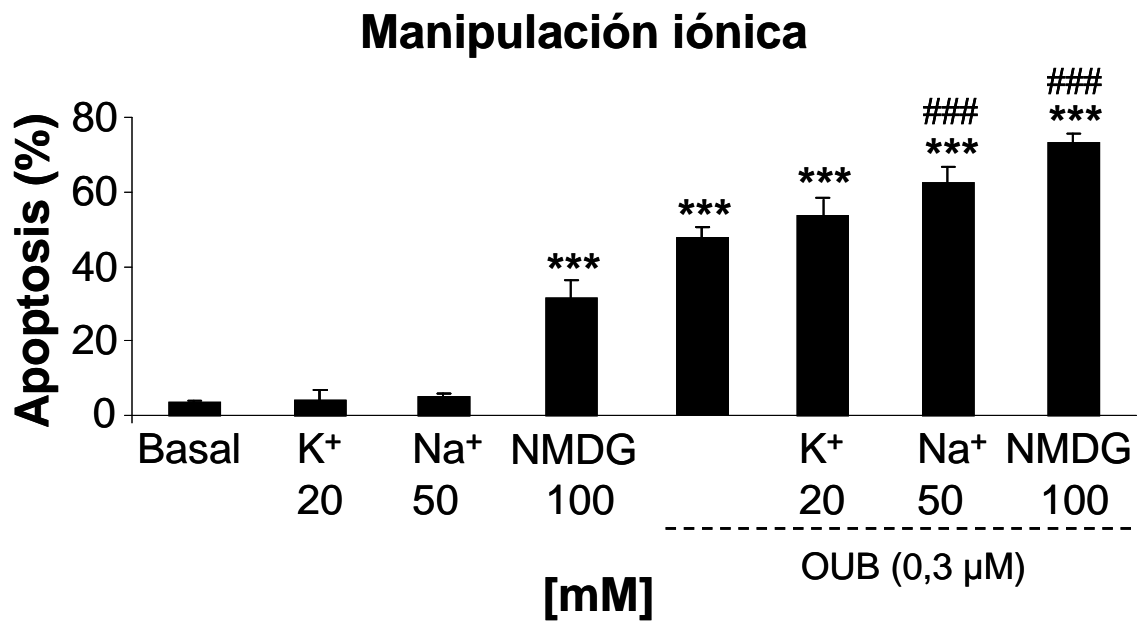


Figura 33. Efecto de la manipulación iónica sobre la apoptosis de células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las distintas manipulaciones y concentraciones empleadas. La adición al medio de 50 mM de sodio (Na⁺) o de 20 mM de (K⁺) durante 24 h no resulta tóxica *per se* para las células, induciendo unos valores de apoptosis en torno al 5%. Sin embargo, a 100 μM la N-metil-D-glutamina (NMDG), incrementa significativamente la apoptosis con respecto a la basal registrando un valor de apoptosis del 34,4%. El K⁺ no modifica significativamente la apoptosis con respecto a la de la ouabaína (OUB) sola, presentando un valor del 52,2%. La toxicidad se incrementa de forma significativa con respecto a la del digitálico sólo cuando además se añade al medio 50 mM de Na⁺ o 100 μM de NMDG, hasta alcanzar valores del 62 y 73% respectivamente. Los datos son las medias ± las desviaciones estándar de 6 experimentos en el caso del ión K⁺, de 11 en el caso del ión Na⁺, y 5 para NMDG. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** p<0,001 respecto a la basal y ### p<0,001 respecto a la OUB sola.

5.2. Quelantes de calcio

Puesto que uno de los mecanismos clásicos de toxicidad celular está relacionado con un desbalance y un incremento de la concentración citosólica de calcio ($[Ca^{2+}]_c$), nuestro siguiente abordaje fue el empleo de quelantes de Ca^{2+} como el EGTA-AM y el BAPTA-AM con el fin de disminuir la cantidad intracelular de este ión y tratar así de revertir la toxicidad ouabaínica, si es que estuviera promovida a través de este mecanismo.

La **figura 34** refleja que el quelante de Ca^{2+} permeable EGTA-AM, a las concentraciones de 50 y 200 μM no resulta tóxico por sí mismo para las células en exposiciones de 30 min, mostrando unos valores de apoptosis del 3,2 y 2,5% respectivamente, muy similares al control o basal (<5%). Cuando además de esta preincubación se exponían las células a 0,3 μM del digitálico ouabaína durante 24 h, la toxicidad se incrementaba un 15 y un 19% con respecto a la de la ouabaína sola, para cada una de las respectivas concentraciones del quelante, alcanzando la significación estadística en ambos casos (n=3).

RESULTADOS

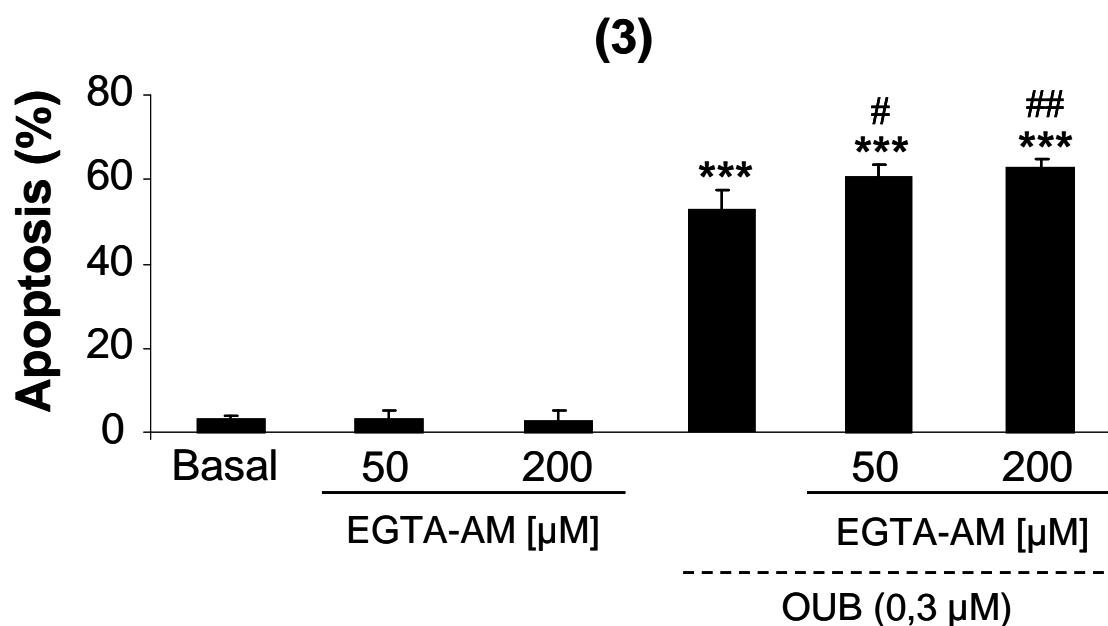


Figura 34. Efecto del quelante de calcio EGTA-AM sobre la apoptosis de células HeLa.

En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las distintas concentraciones de EGTA-AM empleadas. El EGTA-AM 50 y 200 μM *per se* no resulta tóxico para las células, mostrando unos valores de apoptosis similares al basal (<5%). Sin embargo, con el digitálico se incrementa de manera significativa la apoptosis con respecto a la de la ouabaína (OUB) sólo, alcanzando valores de 60,4 y 62,6% respectivamente. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal, # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ respecto a la OUB sola.

Por otra parte, el quelante de Ca^{2+} BAPTA-AM, más rápido que el anterior, a las concentraciones de 100 y 200 μM indujo *per se* una

RESULTADOS

toxicidad significativamente mayor (61 y 86% respectivamente) a la basal (<5%) en incubaciones de 30 min. Cuando además de esto se exponían las células a 0,3 μ M de ouabaína durante 24 h, la apoptosis era significativamente mayor que la del digitálico sólo (un 42, 43 y 56 % para cada una de las respectivas concentraciones del quelante) (n=6) (Figura 35).

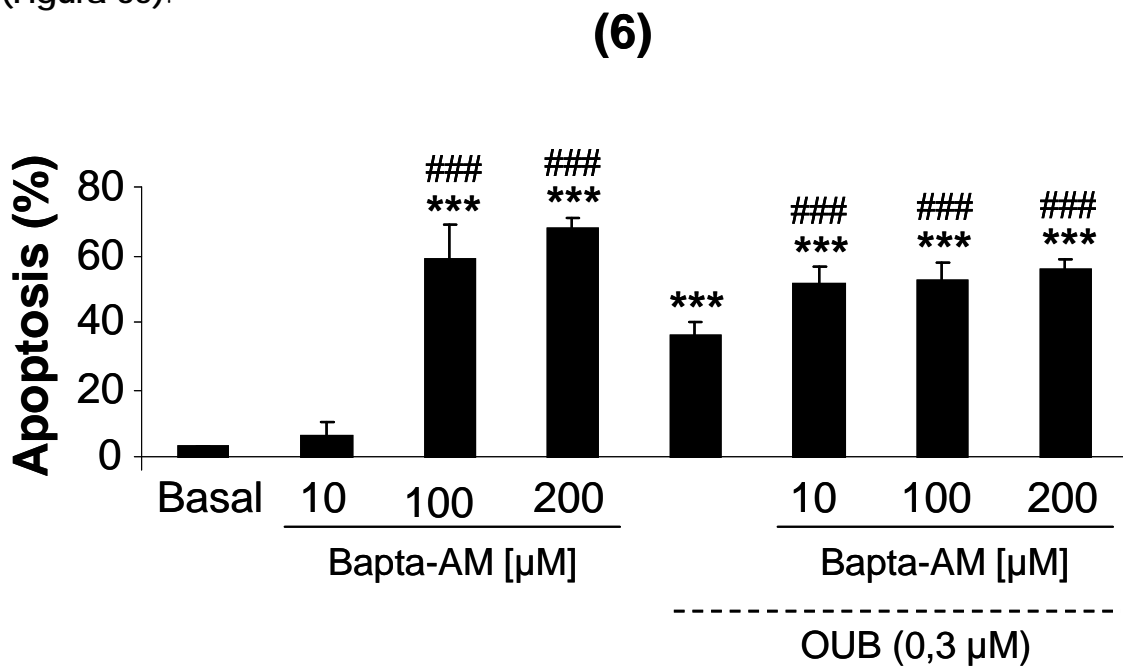


Figura 35. Efecto del quelante de calcio BAPTA-AM sobre la apoptosis de células HeLa.

En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las distintas concentraciones de BAPTA-AM empleadas. BAPTA-AM 100 y 200 μ M incrementa significativamente la toxicidad con respecto a la basal hasta alcanzar valores de 58,3 y 67,5 respectivamente. Si además se incubaba con ouabaina (OUB) 0,3 μ M, se incrementa significativamente la apoptosis con respecto a la del digitálico solo hasta valores de 51,5, 51,9 y 55,6% para 10, 100 y 200 μ M del quelante. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 6 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal y ### $p < 0,001$ respecto a la OUB sola.

Esta mayor toxicidad provocada por los quelantes de Ca^{2+} EGTA-AM y BAPTA-AM, podría explicarse por la total carencia de este ión en el interior celular, lo que se traduciría en una mayor apoptosis celular. Además, el hecho de que no protejan de la toxicidad ouabaínica, nos hace pensar que quizá ésta esté ocurriendo por un mecanismo no dependiente directamente de Ca^{2+} .

5.3. Radicales libres y antioxidantes

Hay bibliografía reciente que relaciona la apoptosis inducida por glicósidos cardíacos con la producción de radicales libres en distintos modelos celulares (Ho y col., 2011, Wasserstrom 2011). Para saber si éste mecanismo estaba implicado en la toxicidad ouabaínica en las células HeLa, empleamos distintos antioxidantes y antirradicales libres, preincubados durante 24 h y co-incubados otras 24 h adicionales con el digitálico, con el fin de intentar revertir la apoptosis observada.

La **figura 36** recoge los resultados y muestra que ni la vitamina C (30 mg/mL), ni el trolox, parte activa de la vitamina E (30 μM) consiguieron revertir la toxicidad del digitálico en nuestro modelo cuando se preincubaban durante 24 h y posteriormente se co-incubaban con el digitálico 24 h adicionales. Sólo la N-acetilcisteína (NAC) a 30 μM , cuya función no es únicamente antioxidante, consiguió revertir de forma significativa (40%) la toxicidad de la ouabaína ($n=3$).

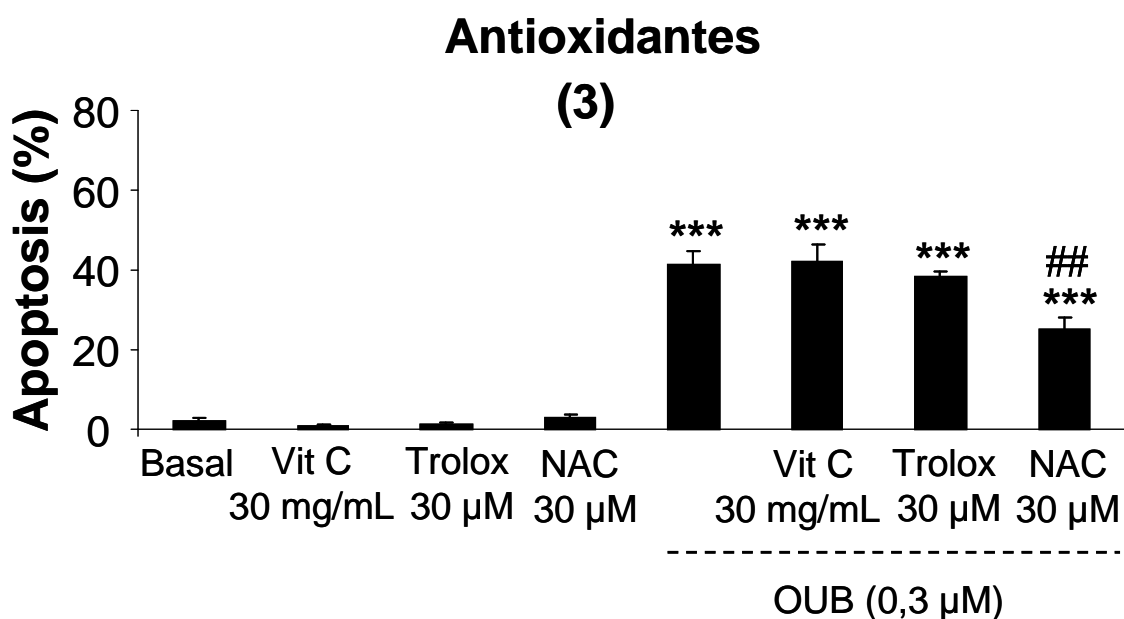


Figura 36. Efectos de los antioxidantes vitamina C (Vit c), trolox y N-acetilcisteína (NAC) sobre la toxicidad de la ouabaína (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa los distintas antioxidantes empleadas. Ninguno de los tres resulta tóxico per se para las células y muestran unos valores de apoptosis similares al basal (<5%). Cuando se co-incubaban con OUB, ninguno consigue revertir la toxicidad digitálica alcanzando unos valores de apoptosis del 41,9% para la Vit C, y 38,9% para el trolox. Sólo la NAC consigue revertir de forma significativa la apoptosis digitálica en un 40% (hasta un valor de 25,2%). Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal y ## $p < 0,01$ respecto a la OUB sola.

RESULTADOS

El antioxidante glutathion (Glut) resultó ser tóxico *per se* para las células HeLa cuando se incubaban con éste compuesto durante 30 min induciendo una apoptosis del 8,5%, significativamente mayor que la basal (2,2%). Además, preincubado 30 min antes y co-incubado con ouabaína durante 24 h adicionales, no consiguió reducir la toxicidad digitálica (41,2%), obteniéndose unos valores de apoptosis del 39,2%(n=4) (Figura 37).

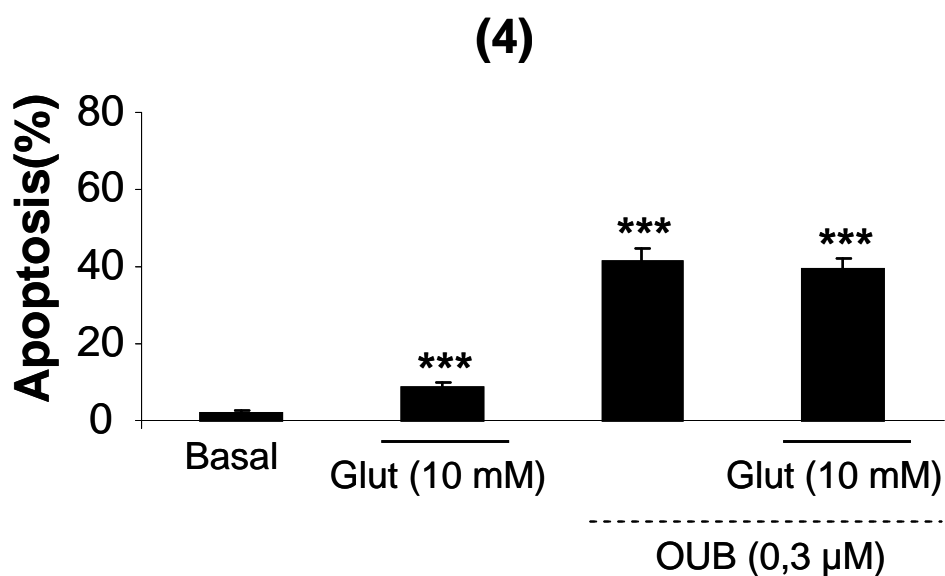


Figura 37. Efectos del glutathion (Glut) sobre la toxicidad de la ouabaína (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las distintas estrategias empleadas. El Glut induce un incremento significativo de la apoptosis con respecto a la basal, alcanzando un valor del 8,5%. Además su co-incubación con OUB no revierte la toxicidad digitálica que alcanza un valor del 41,2%. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

RESULTADOS

El antioxidante resveratrol (3 y 10 μM) indujo *per se* una apoptosis significativamente mayor que la basal (<5%) alcanzando valores de 7 y 16% respectivamente. Si además de la preincubación con resveratrol 1 ó 3 μM , las células se co-incubaban con ouabaína 0,3 μM durante 24 h adicionales, la toxicidad del digitálico aumentaba un 36% y un 49% respectivamente (hasta alcanzar valores de apoptosis del 56% y 61,06%). El resveratrol a 10 μM co-incubado con el digitálico 24 h adicionales, no modificó la toxicidad de la ouabaína, mostrando un valor de apoptosis del 43,3% frente al 41% del digitálico sólo (n=3) **(Figura 38)**.

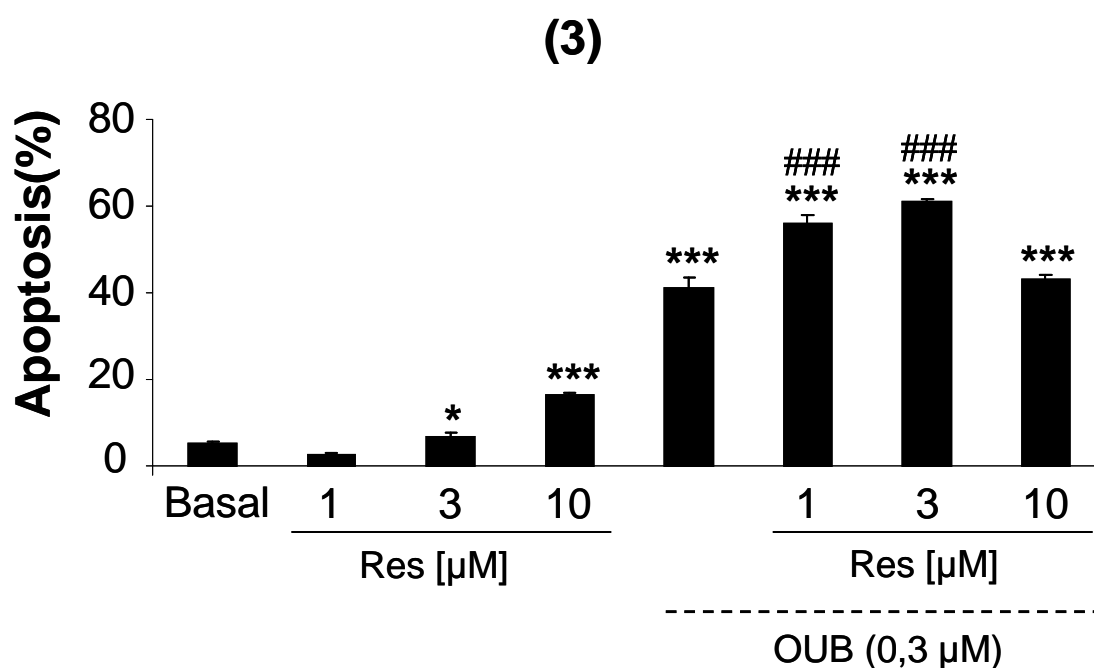


Figura 38. Efectos del resveratrol (Res) sobre la toxicidad de la ouabaina (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. El Res a 3 y 10 μM incrementa significativamente la apoptosis con respecto a la basal, hasta alcanzar valores del 6,9 y 16,3% respectivamente. Además, la preincubación de 1 o 3 μM de Res y posterior co-incubación con OUB durante 24 h adicionales, incrementa significativamente la toxicidad con respecto a la de OUB sola, alcanzando valores de apoptosis del 56 y 61% respectivamente. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. * $p<0,05$, *** $p<0,001$, respecto a la basal y ### $p<0,001$ respecto a la OUB sola.

El compuesto ITH12233/IQM 9.21, derivado del ácido L-glutámico y sintetizado por el Instituto de Química Médica del CSIC y estudiado

RESULTADOS

farmacológicamente en el Instituto Teófilo Hernando de la UAM, que ha demostrado magníficas cualidades como neuroprotector y antioxidante en otros modelos (Maroto y col., 2011), sin embargo no consiguió revertir la toxicidad ouabaínica en el nuestro.

La incubación de las células con éste compuesto durante 24 h, produjo un incremento significativo de la apoptosis con respecto a la basal (<5%) hasta valores de 6,5% para 0,5 μ M, 9,4% para 10 μ M y 13,1% para 30 μ M de ITH33122/IQM 9,21). Además cuando se preincubaba 24 h y posteriormente se co-incubaba con el digitálico durante 24 h adicionales a las concentraciones de 10 y 30 μ M, aumentó significativamente la toxicidad ouabaínica (un 36,8 y 37%) hasta valores de apoptosis del 63,1 y 64,5% respectivamente. Las concentraciones menores del protector ITH33122/IQM 9,21 (0,5 y 3 μ M), tampoco revirtieron la toxicidad del digitálico; es más, también se incrementó hasta valores del 52,6 y 58,1% respectivamente, aunque en este caso no llegó a alcanzar la significación estadística (n=3) **(Figura 39)**.

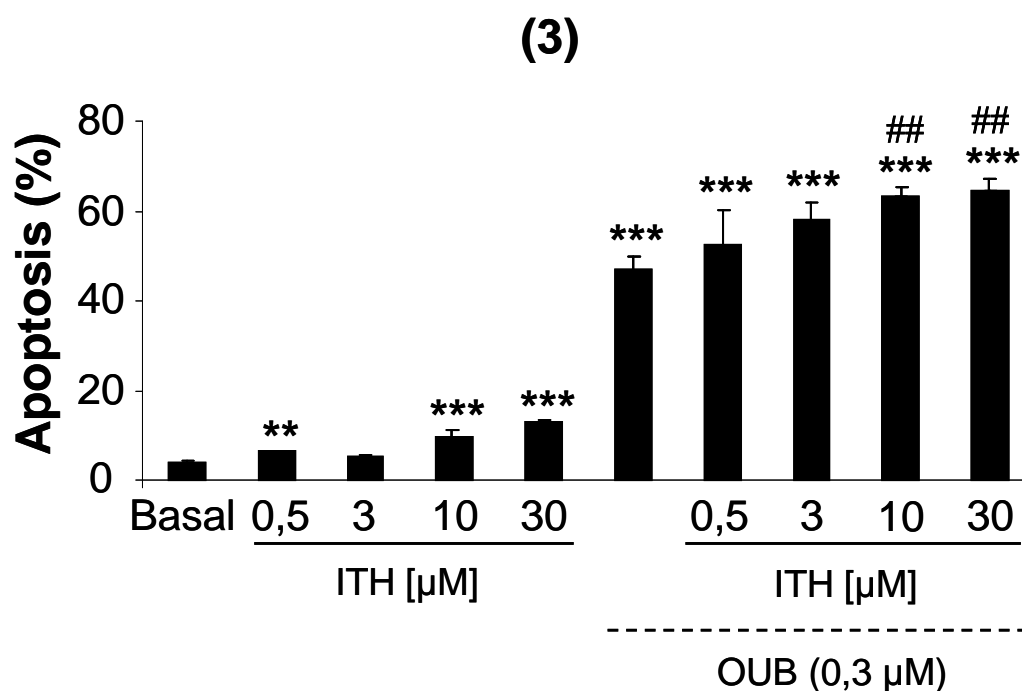


Figura 39. Efectos del compuesto ITH33122/IQM 9,21 (ITH) sobre la toxicidad de la ouabaina (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las distintas concentraciones empleadas. ITH33122/IQM 9,21 incrementa la apoptosis con respecto a la basal alcanzando la significación estadística las concentraciones de 0,5, 10 y 30 μ M (muestran valores de apoptosis del 6,5, 9,4 y 13,1% respectivamente). Además la co-incubación de 10 y 30 μ M con OUB aumenta de forma significativa la apoptosis con respecto a la del digitalico solo (llegando a valores de apoptosis de 63,1 y 64,5%). Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, respecto a la basal y ## $p < 0,01$ respecto a la OUB sola.

RESULTADOS

Puesto que la ouabaína es un potente inductor de la formación de óxido nítrico (NO), del enzima inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) y de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Gan y col., 2012) y que ROS puede modular la actividad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Zhang y col., 2008), decidimos ver si con un donador de NO como el compuesto SNAP remedábamos este efecto.

Curiosamente, la incubación de las células durante 24 h con 30 μM de este compuesto, no incrementó la apoptosis con respecto a la basal mostrando un valor de la misma del 3,5%. Sin embargo preincubado durante las 24 h previas al digitálico y co-incubado con él durante 24 h adicionales, incrementó la apoptosis un 13,5% con respecto a la de la ouabaína sola, hasta alcanzar un valor de apoptosis del 56,6%, aunque no alcanzó la significación estadística ($n=3$) (**Figura 40**).

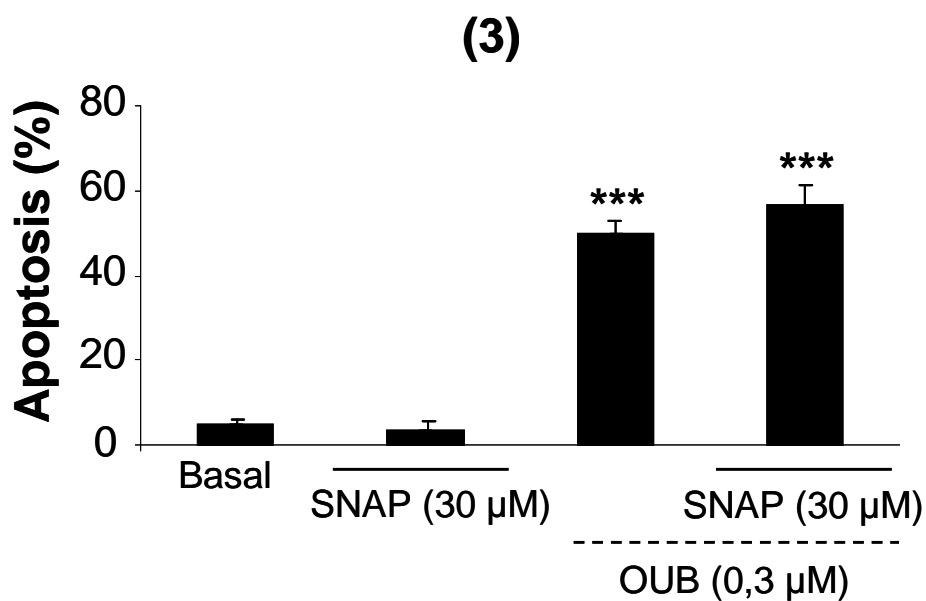


Figura 40. Efectos del donador de óxido nítrico SNAP sobre la toxicidad de la ouabaína (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. La preincubación durante 24 h del compuesto y posterior co-incubación durante 24 h adicionales con el digitálico no modifica la apoptosis ouabaínica. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

Los resultados descritos en el punto 5.3 de este capítulo, parecen descartar un mecanismo oxidante con implicación de radicales libres como responsable de la apoptosis que induce la ouabaína en nuestro modelo celular.

5.4. Manipulaciones farmacológicas en el RE

El RE es una organela celular fundamental en la gestión del Ca^{2+} en la célula, ya que se encarga, entre otras cosas, de su almacenamiento. El Ca^{2+} accede y sale del RE a través de distintos receptores y bombas que si se manipulan con distintas herramientas farmacológicas, pueden modificar la circulación del ión y su concentración en el citosol.

La histamina genera un segundo mensajero, inositol trifosfato (InsP_3), que al activar su receptor (InsP_3R) en el RE provoca la salida de Ca^{2+} desde esta organela al citosol. Por esta razón decidimos explorar el efecto de este compuesto en la toxicidad ouabaínica.

La incubación de las células con concentraciones de 100 y 300 μM de histamina, incrementó significativamente la toxicidad con respecto a la basal hasta valores de apoptosis del 23 y 21,5% respectivamente. Cuando además se co-incubaba durante 24 h adicionales con 0,3 μM del digitálico, se indujo una apoptosis mayor que la producida por la ouabaína sólo, alcanzando un valor del 57% y la significación estadística con 300 μM de histamina (n=6) (**Figura 41**).

(6)

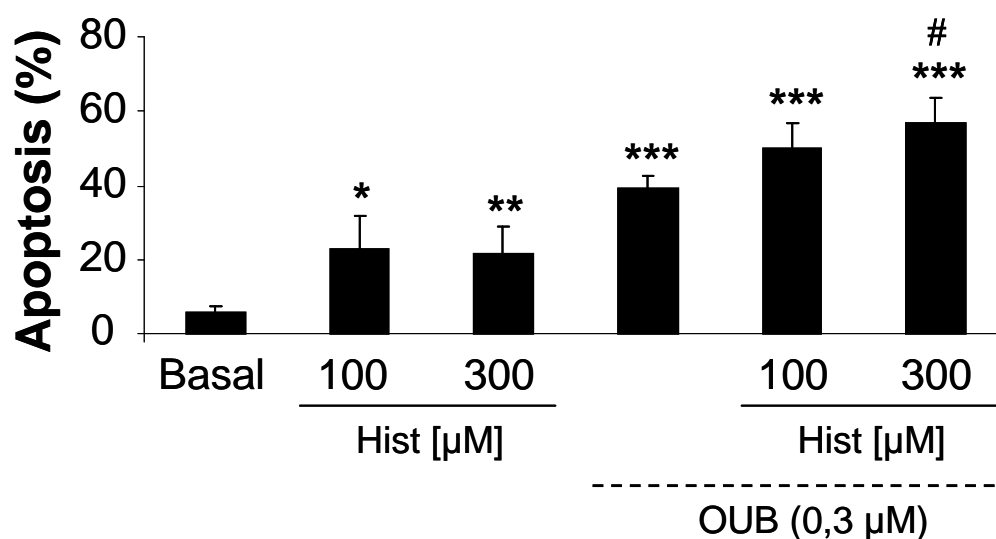


Figura 41. Efectos de la histamina (Hist) sobre la toxicidad de la ouabaína (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. La Hist induce *per se* una apoptosis significativamente mayor a la basal alcanzando valores del 23 y 21,5%. La co-incubación de Hist 300 μ M con el digitálico incrementa significativamente la toxicidad (un 46%) con respecto a la ouabaína sola hasta valores de apoptosis del 57%. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 6 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó cuádruplicado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto a la basal y # $p < 0,05$ respecto a la OUB sola.

Para evitar la salida de Ca^{2+} desde el (RE) al citosol a través del InsP_3R empleamos un bloqueante del mismo, 2-APB. Este compuesto a la concentración de 10 μ M incubado durante 24 h no incrementó *per se*

RESULTADOS

la apoptosis con respecto a la basal, alcanzando esta un valor del 4,8%. La preincubación de las células con 10 μM de 2-APB durante 24 h y su posterior co-incubación durante 24 h adicionales con 0,3 μM de ouabaína, incrementó un 19% la toxicidad digitálica, sin llegar a alcanzar la significación estadística (hasta valores de apoptosis del 48%) (n=8) (Figura 42).

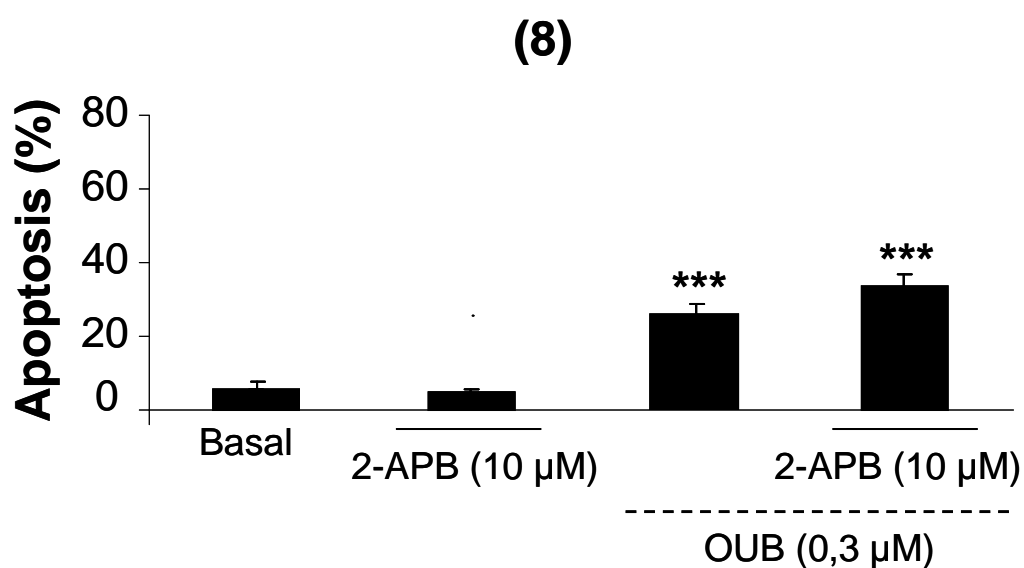


Figura 42. Efectos del 2-APB sobre la toxicidad de la ouabaína (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. El 2-APB *per se* no incrementa la toxicidad con respecto a la basal (<5%). Cuando se co-incuba con OUB la toxicidad se incrementa un 19% con respecto a la del digitálico sólo hasta alcanzar un valor de apoptosis del 48%, pero este incremento no es significativo. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 8 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuádruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

RESULTADOS

La cafeína, un agonista del receptor de rianodina (RyR), también libera Ca^{2+} del RE, motivo por el que la empleamos para estudiar su efecto en la toxicidad digitálica. La incubación de las células durante 24 h con 10 mM de esta xantina indujo una apoptosis significativamente mayor que la basal, hasta alcanzar un valor del 36,4%. Además su preincubación durante 24 h seguida de una co-incubación durante 24 h adicionales con 0,3 μM de ouabaína, incrementó de forma significativa (un 33%) la toxicidad respecto a la del digitálico solo hasta un valor de apoptosis del 49% (n=3) (**Figura 43**).

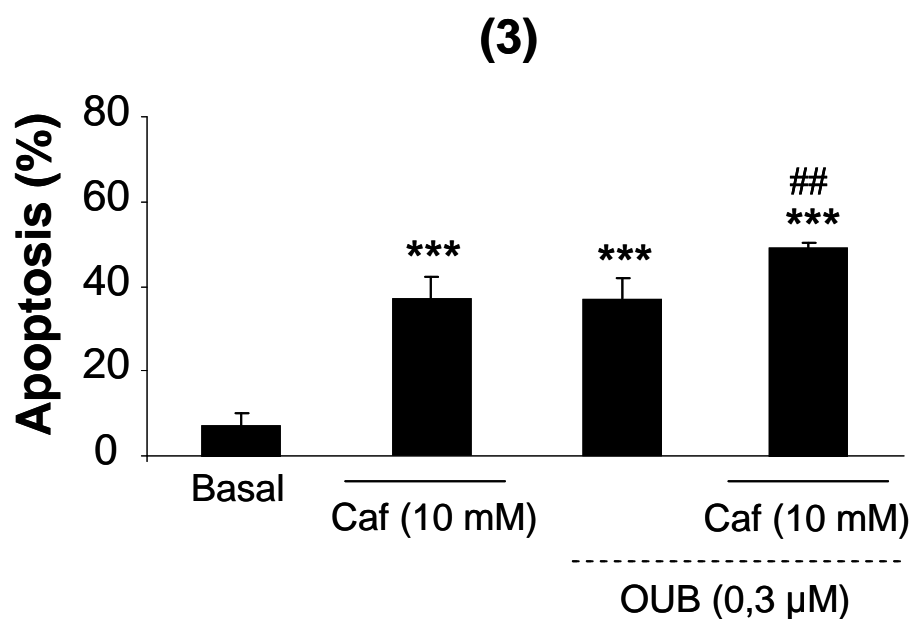


Figura 43. Efectos de la cafeína (Caf) sobre la toxicidad de la ouabaína (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. La Caf induce per se una apoptosis significativamente mayor a basal hasta un valor del 36,4%. La preincubación durante 24 h y posterior co-incubación con ouabaína durante 24 h adicionales, incrementa la toxicidad de forma significativa con respecto a la que produce la OUB sola. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal y ## $p < 0,01$ respecto a la OUB sola.

A tenor de los resultados recogidos en el punto 5.4 de este capítulo, parece que la salida de Ca^{2+} al citosol a través de distintos receptores del RE, contribuye a incrementar significativamente la toxicidad que la ouabaína produce en nuestro modelo, aunque

paradójicamente, alguno de ellos como el RyR, no es activo en las células HeLa.

5.5. Manipulaciones farmacológicas en la mitocondria

Por el mismo motivo por el que exploramos el papel del RE, planteamos algunos experimentos encaminados a establecer la participación de la principal organela tamponadora de Ca^{2+} de la célula en la apoptosis que la ouabaina produce en las células HeLa.

El CGP37157 es un bloqueante inespecífico del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial, que también bloquea el intercambiador de la membrana plasmática del cual carecen las células HeLa, como ya hemos mencionado con anterioridad. La incubación de las células con 30 y 100 μM de este compuesto durante 30 min indujo una toxicidad significativamente mayor que la basal (hasta alcanzar valores del 10 y 7,7% respectivamente). Además el GCP37157 preincubado durante 30 min y co-incubado 24 h adicionales con el digitálico, incrementó la apoptosis con respecto a la del digitálico sólo, alcanzando la significación estadística las concentraciones de 10 y 100 μM (incrementaron la toxicidad digitálica un 64,3 y un 90% respectivamente) hasta llegar a valores de apoptosis del 53 y 62,3% (n=3) (**Figura 44**).

(3)

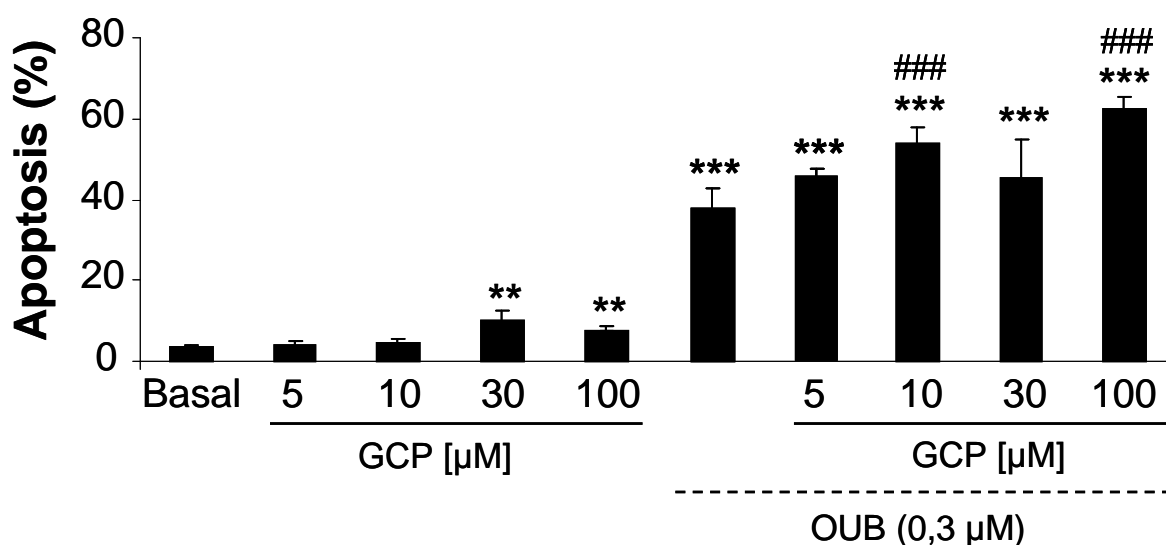


Figura 44. Efectos del GCP37157 (GCP) sobre la toxicidad de la ouabaina (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. El GCP37157 a las concentraciones de 30 y 100 μM , produce una toxicidad significativamente mayor que la basal (<5%) hasta llegar a valores de apoptosis del 10 y 7,7% respectivamente. Cuando se co-incuba, a la concentración de 10 y 100 μM , con el digitálico la toxicidad se incrementa significativamente con respecto a la de la OUB sola, hasta valores de apoptosis del 45,2 y 62,3% para cada una de las concentraciones. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ respecto a la basal y ### $p < 0,001$ respecto a la OUB sola.

RESULTADOS

Curiosamente los dos bloqueantes del poro de transición mitocondrial empleados por el cual el citocromo c sale al citosol, indujeron una apoptosis significativamente mayor a la producida por la ouabaína sola.

Concretamente, la ciclosporina A (3 μ M) *per se* no modificó la toxicidad con respecto a la basal (<5%). Sin embargo, cuando se preincubaba durante 24 h y posteriormente se co-incubaba 24 h adicionales con el digitálico, indujo un incremento significativo de la toxicidad con respecto a la ouabaína sola de un 45%, alcanzando valores de apoptosis del 72% (n=3) (**Figura 45**).

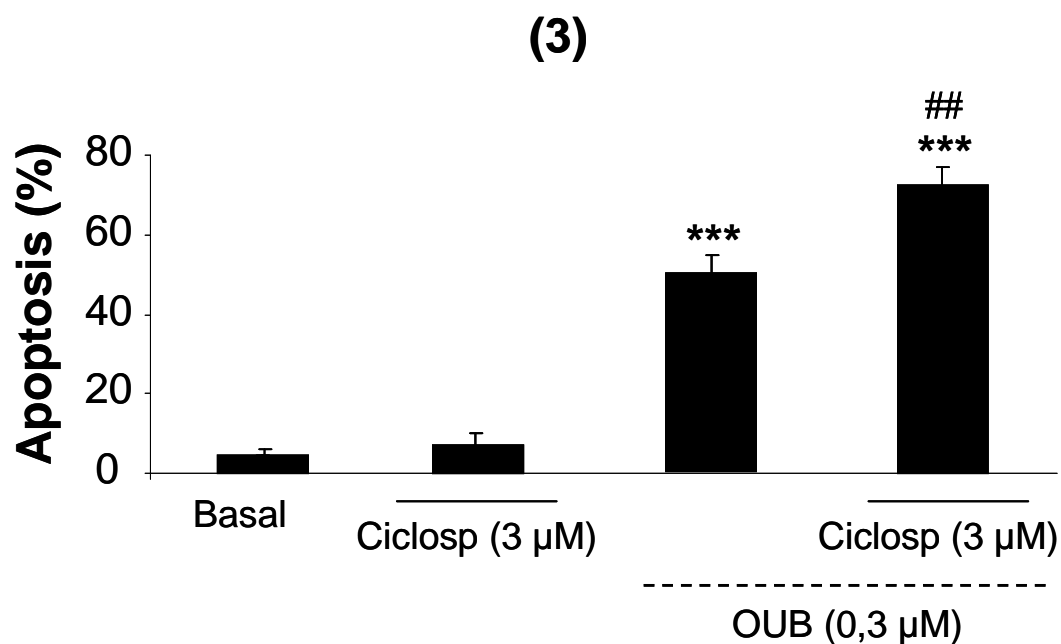


Figura 45. Efectos de la ciclosporina A (Ciclosp) sobre la toxicidad de la ouabaína (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. La Ciclosp *per se* no incrementa la apoptosis con respecto a la basal, pero cuando se co-incuba con OUB induce una apoptosis significativamente mayor que la de la OUB sola hasta alcanzar un valor del 72%. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal y ## $p < 0,01$ respecto a la OUB sola.

La dimebona por su parte, el otro bloqueante del poro de transición mitocondrial empleado, tampoco revirtió la toxicidad ouabaínica. Es más, ella sola *per se* a la concentración de 1 µM durante 24 h indujo una apoptosis del 11%, significativamente mayor que la basal (<5%). Cuando además la dimebona a 30 µM se co-incubaba

RESULTADOS

durante 24 h adicionales con el digitálico, la toxicidad se incrementaba un 29,7% con respecto a la de la ouabaína sola hasta alcanzar un valor de apoptosis del 58,2% (n=4) (Figura 46).

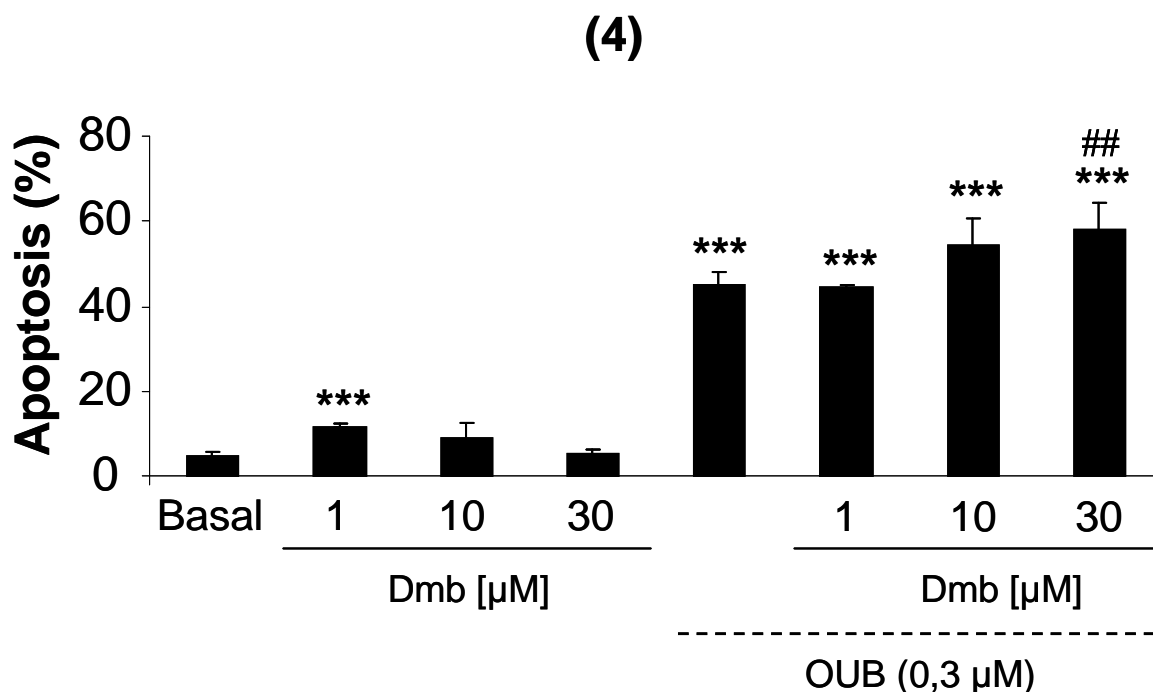


Figura 46. Efectos de la dimebona (Dmb) sobre la toxicidad de la ouabaína (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. La Dmb a la concentración de 1 μM produce una toxicidad del 11% que es significativamente mayor que la basal (<5%). La co-incubación de 30 μM de Dmb con OUB incrementa significativamente la apoptosis con respecto a la producida por el digitálico solo, alcanzando un valor de apoptosis del 58,2%. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal y ## $p < 0,01$ respecto a la OUB sola.

5.6. Otras manipulaciones

Con el objetivo de proteger a las células HeLa de la toxicidad de la ouabaína, realizamos otras aproximaciones con distintas herramientas farmacológicas que potencialmente podrían conseguirlo. Para ello seguimos con el mismo protocolo anterior, de preincubaciones durante 30 min, 1 ó 24 h y posteriores co-incubaciones durante 24 h adicionales con el digitálico.

El compuesto estudiado fue el U73122, un inhibidor de la fosfolipasa C (PLC). La exposición de las células a 5 y 10 μM de este compuesto durante 24 h incrementó la toxicidad con respecto a la basal (<5%) alcanzando la significación estadística la menor de ellas con un valor de apoptosis del 19%. Cuando además se co-incubaba con el digitálico 24 h adicionales, la toxicidad se incrementaba significativamente un 50,8% con respecto a la del digitálico sólo (n=2) (**Figura 47**).

Este mismo experimento pero con tiempos de exposición a U73122 más cortos (10 min o 1 h) o una menor concentración del mismo (2 μM) rebajaron la toxicidad del compuesto *per se* a valores próximos al basal (<5%) pero no modificaron la apoptosis producida por el digitálico que continuó mostrando unos valores cercanos al 40% (n=4). Estos datos no se recogen en una figura en esta memoria por no aportar información adicional relevante.

(2)

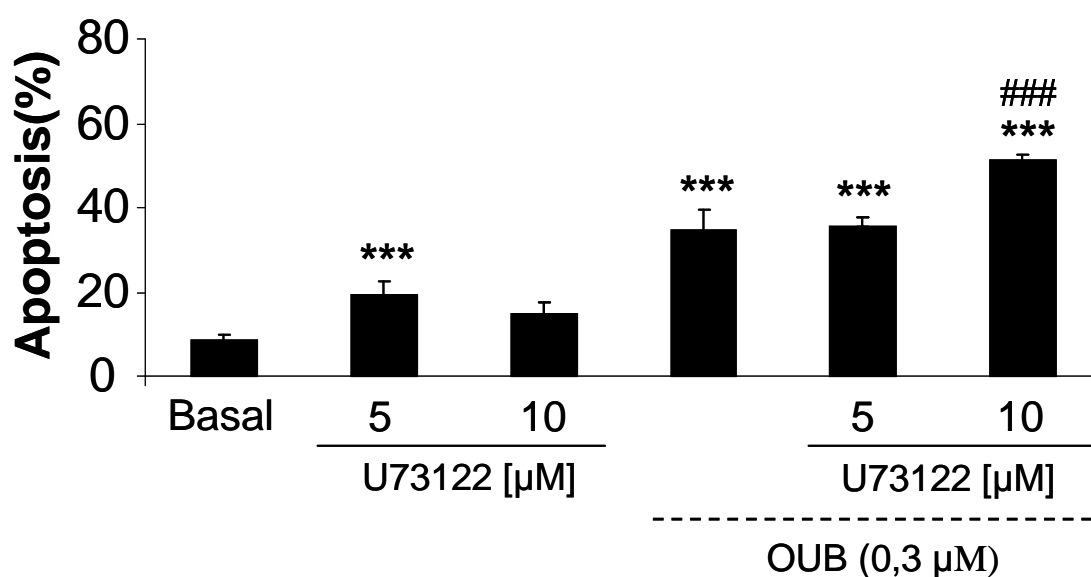


Figura 47. Efectos del compuesto U73122 sobre la toxicidad de la ouabaína (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. El U73122 (5 μ M) produce una toxicidad significativamente mayor que la basal, alcanzando un valor de apoptosis del 19%. La co-incubación con OUB, incrementa la apoptosis de forma significativa (un 50,8%) con respecto a la del digitalico solo. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 2 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal y ### $p < 0,001$ respecto a la OUB sola.

Los siguientes experimentos están basados en la observación previa de la internalización de un derivado Bodipy de la ouabaína cuando se incubaban las células con él (dato recogido en la figura 25 de éste capítulo). Por ello, decidimos emplear inhibidores de la endocitosis para

RESULTADOS

intentar así evitar que el digitálico ejerciera su papel citotóxico en nuestro modelo a través de la endocitosis de la bomba Na^+/K^+ ATPasa. Escogimos la cloroquina, que actúa vía clatrina inhibiendo la vía lenta de la endocitosis, y la genisteína que actúa vía dinamina inhibiendo la vía rápida de la misma y cuyo efecto es menos selectivo.

La mera incubación de las células con cloroquina durante 24 h resultó tóxica para las células alcanzando la significación estadística a 100 y 200 μM de este compuesto (valores de apoptosis del 23 y 37% respectivamente). Si además se co-incubaba con el digitálico durante 24 h adicionales, la toxicidad se incrementaba de forma significativa con respecto a la del digitálico sólo un 85 y 78,4%, respectivamente, hasta alcanzar valores de apoptosis del 68,2 y 65,7% (n=4) (**Figura 48**).

A tiempos de exposición más cortos (1h) con 100 μM de este compuesto inhibidor de la endocitosis, se mantuvo una toxicidad similar a la basal (4,7%). En co-incubación con el digitálico tampoco logramos revertir la toxicidad que como en las exposiciones más largas, se incrementó un 30% con respecto a la del digitálico sólo. Estos datos no se recogen en una figura en esta memoria por no aportar información adicional relevante.

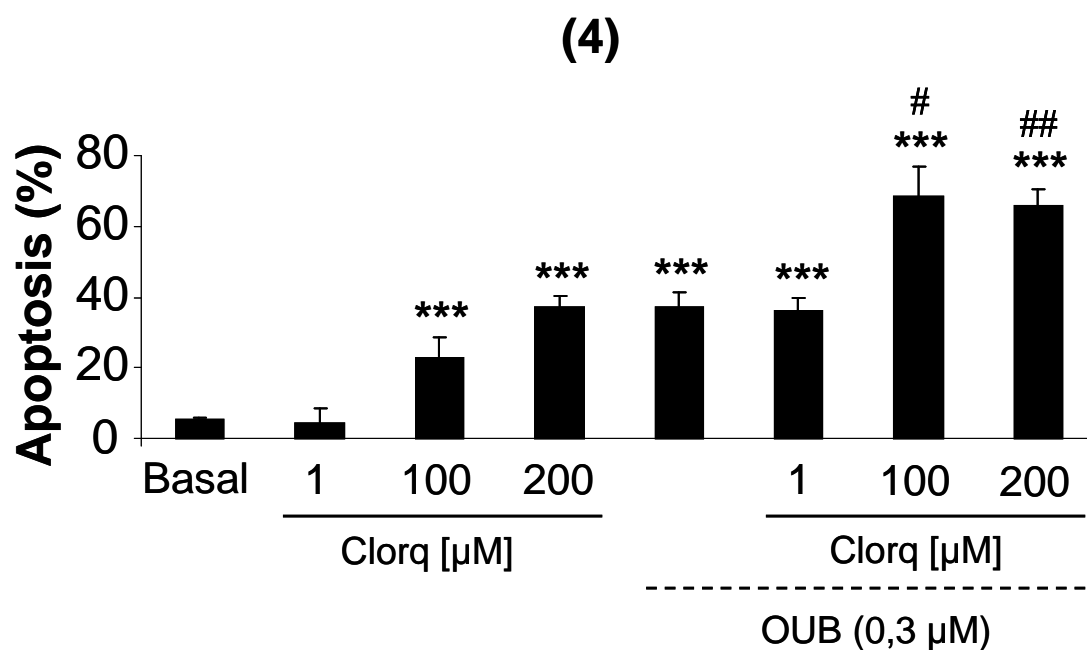


Figura 48. Efectos de la cloroquina (Clorq) sobre la toxicidad de la ouabaina (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. La Clorq (100 y 200 μM) produce una toxicidad significativamente mayor que la basal alcanzando la apoptosis unos valores del 22,8 y 36,86% respectivamente. Cuando además se co-incuba con OUB, la toxicidad se incrementa de forma significativa un 85 y un 78,4% respectivamente con respecto a la producida por el digitálico solo, hasta alcanzar valores de apoptosis del 68,2 y 65,7%. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó al menos por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal, # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ respecto a la OUB sola.

La inhibición de la vía rápida de la endocitosis con genisteína, como en el caso previo de la cloroquina, incrementó significativamente la toxicidad con respecto a la basal, alcanzando la apoptosis valores

RESULTADOS

entre un 11 y un 55% dependiendo de la concentración de inhibidor empleada en incubaciones de 24 h. Cuando además se co-incubaban las concentraciones mayores de este compuesto durante 24 h adicionales con ouabaína, la toxicidad también se incrementaba con respecto a la del digitálico sólo (entre un 80 y un 90%), alcanzando la significación estadística las concentraciones de genisteína de 20, 30, 40, 50 y 100 μM (valores de apoptosis del 82,4, 75, 66,5, 87,7 y 77,7% respectivamente) (n=3) (**Figura 49**).

Puesto que las concentraciones de 1 y 3 μM de genisteína no incrementaban la apoptosis respecto a la basal en incubaciones de 24 h y mostraban una ligerísima tendencia a disminuir la toxicidad del digitálico cuando se co-incubaban con él, ampliamos el número de experimentos con estas concentraciones de inhibidor a 8. Ninguna de ellas resultó eficaz frente a la apoptosis digitálica que mantuvo unos valores del 42 y 40% respectivamente (n=8). Estos datos no se recogen en una figura en esta memoria por no aportar información adicional relevante.

(3)

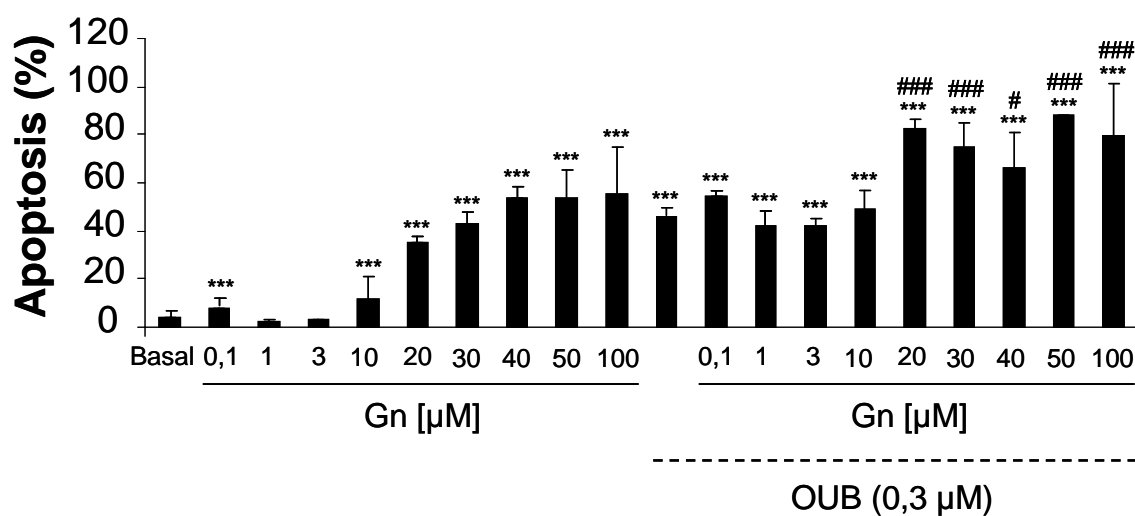


Figura 49. Efectos de la genisteína (Gn) sobre la toxicidad de la ouabaina (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. La incubación con Gn durante 24 h incrementa significativamente la toxicidad con respecto a la basal, salvo las concentraciones de 1 y 3 μM, hasta alcanzar valores entre el 11 y el 55% de apoptosis según la concentración de Gn empleada. Cuando se co-incuba el compuesto (20, 30, 40, 50 y 100 μM) con OUB durante 24 h adicionales, la apoptosis también es significativamente mayor a la del digitalico solo (de un 45 a un 93%) alcanzando la apoptosis un valor entre el 66,5 y el 87,7%. Los datos son las medias ± las desviaciones estándar de 3 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** p<0,001 respecto a la basal, # p<0,05 y ### p<0,001 respecto a la OUB sola.

Finalmente el inhibidor de la proteína cinasa C (PKC) estaurosporina a 0,3 y 1 μM durante 24 h, incrementó drásticamente la apoptosis con respecto a la basal hasta alcanzar valores del 86,2 y 83,5%

RESULTADOS

respectivamente. Cuando además se co-incubaba con el digitálico durante 24 h adicionales, la apoptosis aumentaba de forma muy significativa con respecto a la de la ouabaína sola (un 82 y 97,5% respectivamente) hasta alcanzar valores del 75,5 y 81,8% cada una de ellas (n=3) (Figura 50).

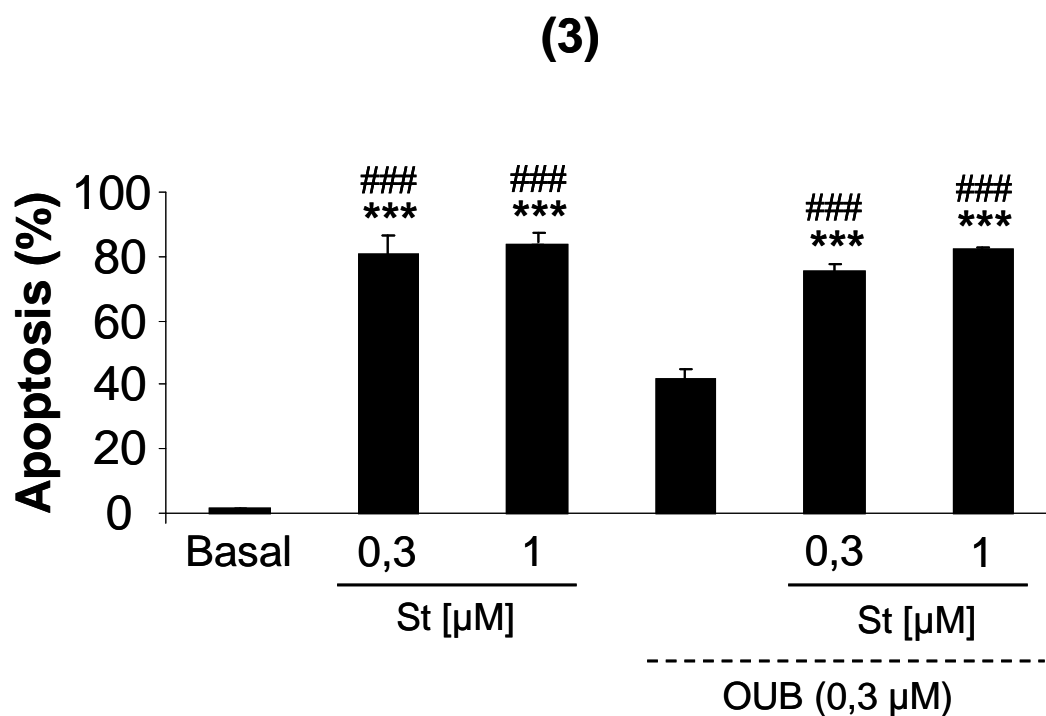


Figura 50. Efectos de la estaurosporina (St) sobre la toxicidad de la ouabaína (OUB) en las células HeLa. En la ordenada se representa el porcentaje de apoptosis y en la abscisa las concentraciones empleadas. La St 0,3 y 1 μM incrementa de forma significativa la toxicidad con respecto al basal hasta valores de apoptosis del 86,2 y 83,5%. Además su co-incubación con OUB incrementa significativamente la apoptosis con respecto a la OUB sola (un 82 y un 97,5% respectivamente) hasta valores del 75,5 y 81,8%. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 3 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal y ### $p < 0,001$ respecto a la OUB sola.

A modo de resumen podríamos decir que salvo la N-acetilcisteína, que redujo la toxicidad un 40%, ninguna de las manipulaciones farmacológicas realizadas y recogidas en el apartado 5 de este capítulo, consiguió revertir la apoptosis que la exposición a ouabaina produce en nuestro modelo; es más, algunos de los compuestos empleados, tradicionalmente protectores o con alguna implicación en las vías clásicas de inducción de daño celular, no solo no la revirtieron sino que la incrementaron, llegando en algunos casos a alcanzar la significación estadística.

Puesto que, aparentemente, en nuestro modelo experimental la ouabaina estaba ejerciendo su efecto tóxico por un mecanismo independiente de los explorados hasta este momento, decidimos estudiar otras posibles vías de inducción de la apoptosis como son las vías intrínseca y extrínseca.

6. Implicación de las caspasas en la toxicidad ouabáinica

Las caspasas son un grupo de proteínas que median la ruptura de otras proteínas implicadas en los procesos apoptóticos. Existen dos vías de inducción de la apoptosis tras la exposición a un estímulo tóxico: una "vía extrínseca" en la que una señal externa o ligando interacciona o se

une con una serie de receptores de muerte situados en la membrana celular, y una “vía intrínseca” o mitocondrial, activada por estrés o tóxicos diversos. Ambas dan lugar a la activación de la maquinaria apoptótica. La activación de una u otra vía conlleva la activación de diferentes caspasas propias de cada una. Las primeras caspasas activas o “caspasas iniciadoras” (8, 9, 10 y 12) activan a su vez a las “caspasas efectoras” (3 y 7) que son las responsables últimas de todo el proceso apoptótico.

Para profundizar en el estudio de los efectos tóxicos de la ouabaina en nuestro modelo celular, decidimos determinar los niveles de algunas de éstas proteasas.

6.1. Caspasas efectoras 3/7

Nuestros primeros pasos estuvieron encaminados a determinar la posible activación de las “caspasas efectoras” -3 y -7, para apoyar nuestro trabajo previo que apuntaba a la muerte de las células HeLa por apoptosis, inducida por la exposición a ouabaina durante 24 h. Los primeros resultados no mostraron activación de caspasas a éste tiempo, seguramente porque su activación tiene lugar en las etapas iniciales de la muerte apoptótica. Al estar reguladas a nivel postraducciona, su activación debe ser rápida. Por éste motivo, acortamos los tiempos de

RESULTADOS

exposición a ouabaína y determinación de caspasas hasta un máximo de 5 h.

La **figura 51** refleja que tras la incubación con 0,3 μM de ouabaína durante 3, 4 y 5h se incrementaron significativamente los niveles de caspasas-3/7 en las células tratadas (462,1, 540,9 y 769,7 RLU/s respectivamente) con respecto a los valores encontrados en las células control (basal) (149,1 RLU/s). La incubación con el control positivo de apoptosis, estaurosporina 1 μM durante 5 h, produjo una activación máxima de estas mismas caspasas (6875,3 RLU/s) que también alcanzó la significación estadística.

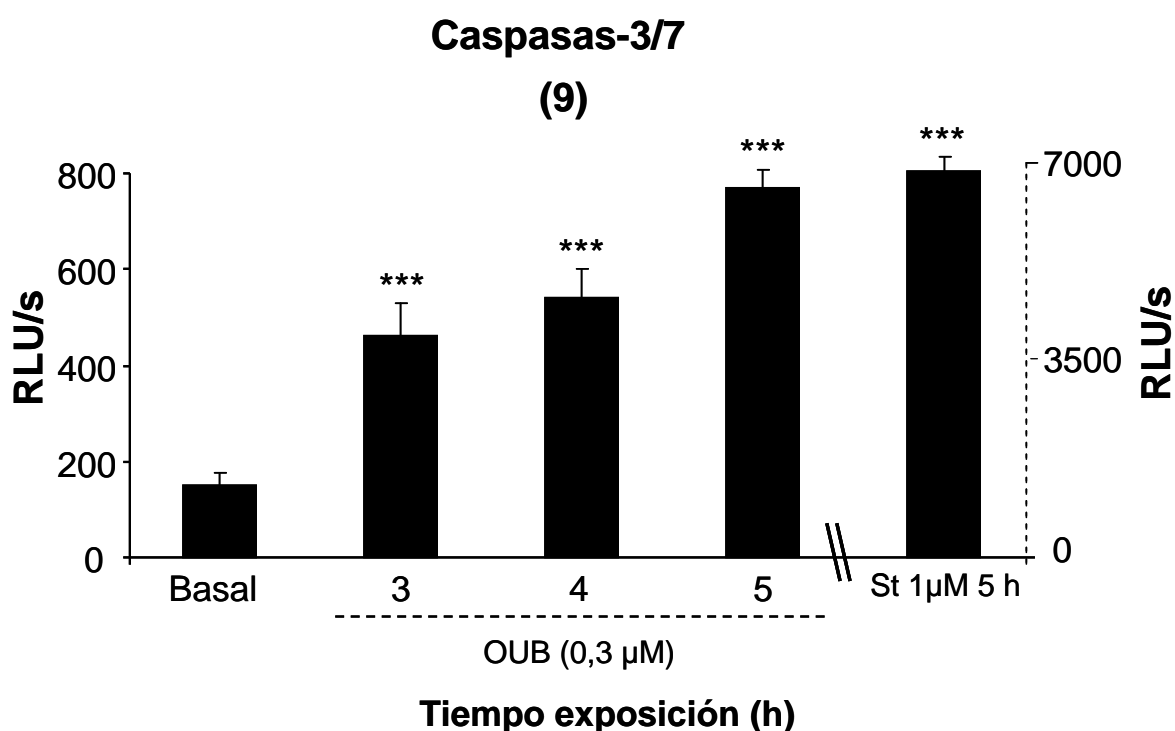


Figura 51. Efectos de la incubación con ouabaína (OUB) sobre las caspasas-3/7. En la ordenada se representan las unidades relativas de luminiscencia por segundo (RLU/s), que correlacionan directamente con la cantidad de caspasas-3/7 activas, y en la abscisa los distintos tiempos de exposición a 0,3 μM de OUB empleados. Tras 3, 4 y 5 h de exposición al digitalico se inducen significativamente los niveles de caspasas-3/7 con respecto al control (basal) hasta valores de 462,1, 540,9 y 769,7 RLU/s respectivamente. El control positivo estaurosporina (St) a 1 μM también incrementa significativamente la activación de estas caspasas (6875,31 RLU/s). Los datos son las medias ± las desviaciones estándar de 9 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuádruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

Tras observar que las caspasas-3/7 estaban activas después de la exposición de las células a 0,3 μM de ouabaína durante 3, 4 y 5 h, el

siguiente paso fue estudiar cual de las vías de activación de la apoptosis (intrínseca y/o extrínseca) estaba mediando la activación de estas caspasas.

6.2. Vía extrínseca

La “vía extrínseca” de la apoptosis está relacionada con los llamados “receptores de muerte”, situados en la membrana plasmática de las células. Estos receptores son capaces de unir un ligando tóxico o de reaccionar ante un estímulo cuando las células están expuestas a él activando así a las llamadas “caspasas iniciadoras”, entre las que se encuentra la caspasa-8. Estas a su vez procesan y activan irreversiblemente a las “caspasas efectoras”, como las caspasas-3/7, desencadenando todo el fenómeno apoptótico.

Para determinar si ésta vía estaba o no implicada en los fenómenos apoptóticos que habíamos observado previamente y en la activación de las caspasas-3/7, cuantificamos los valores de caspasa-8 tras la exposición a 0,3 μ M de ouabaína durante 3, 4 y 5 h.

La **figura 52** muestra que tras la incubación con 0,3 μ M del digitálico durante 3 h, 4 h y 5 h no hubo activación de la caspasa-8 (245,3, 272 y 239,5 RLU/s respectivamente), mostrando las células tratadas unos valores similares a las células control (basal) (305,9 RLU/s). El control

RESULTADOS

positivo, estaurosporina 1 μM durante 5 h, tal y como cabía esperar, sí produjo un incremento significativo de los niveles de caspasa-8 (1670,5 RLU/s) con respecto a los encontrados en las células exentas de tratamiento (305,9 RLU/s) ($n=4$).

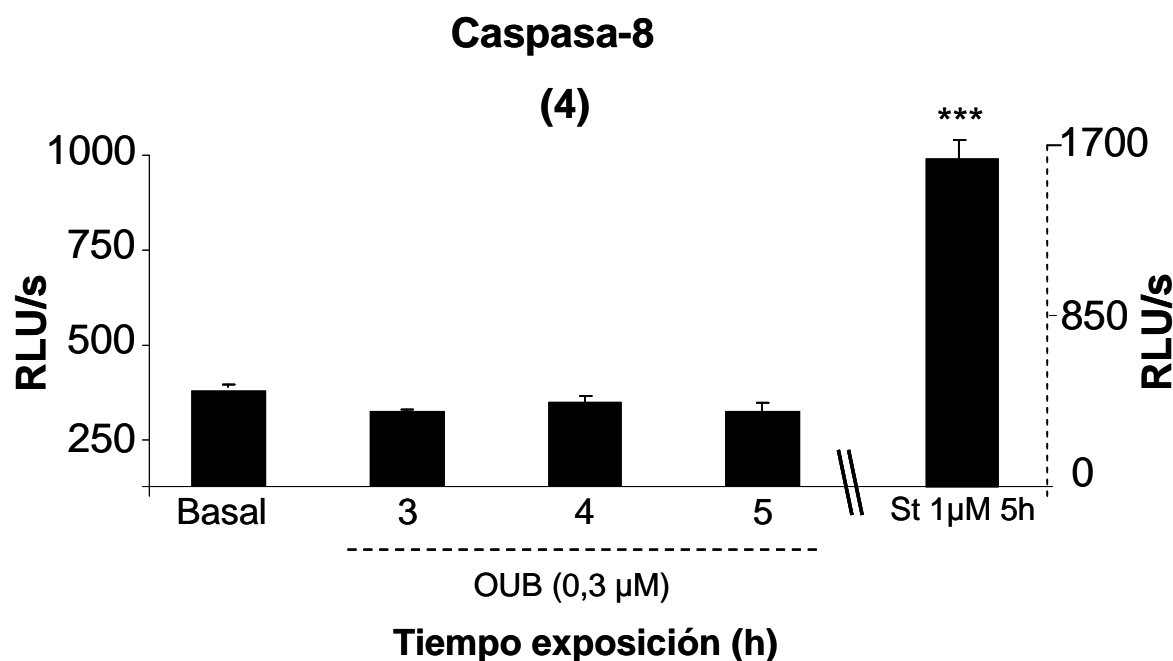


Figura 52. Efectos de la incubación con ouabaína (OUB) sobre la caspasa-8. En la ordenada se representan las unidades relativas de luminiscencia por segundo (RLU/s), que se correlacionan directamente con la cantidad de caspasa-8 activa, y en la abscisa los distintos tiempos de exposición a 0,3 μM de OUB. Tras 3, 4 y 5 h de exposición al digitálico no se inducen los niveles de caspasa-8 con respecto a la basal. El control positivo de apoptosis, estaurosporina (St) 1 μM durante 5 h, sí produce una activación significativa de esta caspasa (1670,5 RLU/s). Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó al menos por cuadruplicado. *** $p<0,001$ respecto a la basal.

De éstos datos inferimos que ésta vía apoptótica (extrínseca) mediada a través de los llamados “receptores de muerte” situados en la membrana plasmática que va acompañada de una activación de la caspasa-8, no es la responsable primera del efecto tóxico del digitálico en nuestro modelo. Por esta causa decidimos explorar el otro camino que pone en marcha todo el mecanismo de la apoptosis, la conocida como “vía intrínseca”.

6.3. Vía intrínseca

La “vía intrínseca” de la apoptosis es conocida también como la “vía mitocondrial”, ya que ésta organela es la principal responsable de la mayoría de los cambios que sufrirá la célula durante el proceso apoptótico. La exposición al estímulo tóxico pone en marcha a las proteínas proapoptóticas mitocondriales las cuales abren un poro en la membrana externa de las mitocondrias por el que salen al exterior diversas proteínas como el citocromo c. Además de esto, otras proteínas que son inhibidoras de los inhibidores de la caspasas (IAPS) salen de la mitocondria dejando a la caspasa-9 mitocondrial libre para poder actuar y comenzar el proceso apoptótico. Esta caspasa posee el mecanismo de activación más complejo de todas las caspasas ya que, además de su procesamiento proteolítico, requiere de una proteína conocida como “factor activador de la apoptosis” (Apaf-1) y de su

RESULTADOS

asociación al citocromo c liberado desde la mitocondria, en un proceso dependiente de ATP.

Para esclarecer si la mitocondria estaba implicada en la toxicidad ouabaínica en nuestro modelo, se expusieron las células una vez más a una concentración de 0,3 μM del digitálico durante 3 h, 4 h y 5 h y se determinaron los niveles de caspasa-9 en la muestra. Como control positivo de apoptosis se empleó estaurosporina a 1 μM durante 5 h. Para establecer los niveles basales de caspasa-9, se contó también con células exentas de tratamiento.

La **figura 53** muestra que las células expuestas a 0,3 μM de ouabaína durante 3, 4 y 5 h presentan una inducción significativa de los niveles de caspasa-9 (1954,9, 1893,8 y 2749,9 RLU/s respectivamente) con respecto a los controles o células en situación basal (649,4 RLU/s). El control positivo con estaurosporina a 1 μM también indujo una clara activación de la caspasa-9 (8722,2 RLU/s), alcanzando la significación estadística (n=5).

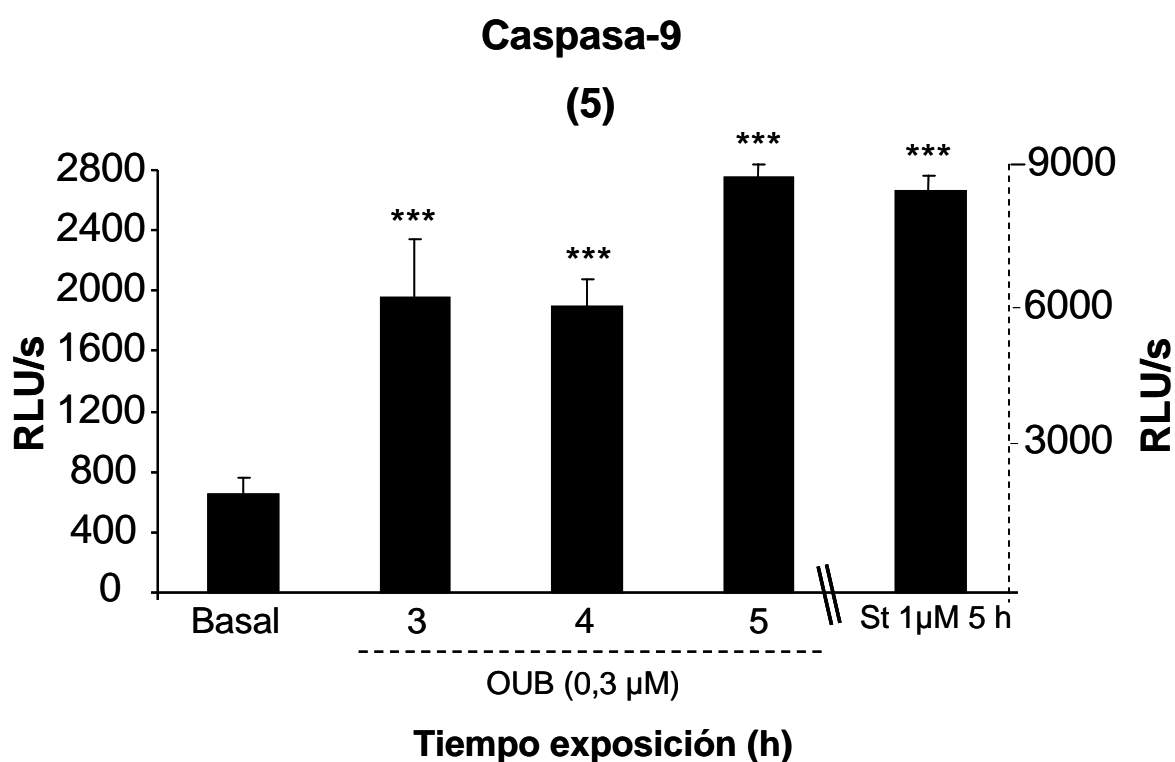


Figura 53. Efectos de la incubación con ouabaína (OUB) sobre la caspasa-9. En la ordenada se representan las unidades relativas de luminiscencia por segundo (RLU/s), que se correlacionan directamente con la cantidad de caspasa-9 activa, y en la abscisa los distintos tiempos de exposición a 0,3 μM de ouabaína. Tras 3, 4 y 5 h de exposición al digitálico se inducen significativamente los niveles de caspasa-9 (1954,9, 1893,8 y 2750 RLU/s respectivamente) con respecto a las células control (basal). El control positivo estaurosporina (St) 1 μM, durante 5 h produce también una activación significativa de la caspasa-9 (8722,2 RLU/s) con respecto a la situación basal. Los datos son las medias ± las desviaciones estándar de 5 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** p<0,001 respecto a la basal.

Estos datos apuntan a la mitocondria como responsable de la toxicidad ouabaínica observada en nuestro modelo en nuestras condiciones experimentales. Explicarían cómo tras la exposición a ouabaína, se produce un daño mitocondrial traducido en la activación de la caspasa-9, iniciadora de la apoptosis, que a su vez activaría irreversiblemente a las caspasas efectoras -3 y -7, desencadenando así toda la cascada apoptótica.

6.3.1. Efectos del Z-LEHD-FMK sobre la actividad de la caspasa-9 y la apoptosis, en presencia de ouabaína

Con el objetivo de comprobar si la activación de la caspasa-9, y por ende la mitocondria, mediara en el daño observado en las células expuestas al digitálico, diseñamos distintos experimentos empleando el antagonista selectivo de caspasa-9, Z-LEHD-FMK.

El primero de los experimentos planteados con este antagonista de caspasa-9, Z-LEHD-FMK, iba dirigido a comprobar que efectivamente, en las condiciones experimentales adecuadas, el compuesto conseguía revertir la activación de la caspasa-9 inducida por la ouabaína.

La **figura 54** muestra que tal y como cabía esperar, la incubación durante 24 h con 10 μ M de este antagonista de la caspasa-9 no induce su activación (11047,7 RLU/s) y las células presentan un valor de ésta

RESULTADOS

similar al control (12790,1 RLU/s). La preincubación durante 24 h con Z-LEHD-FMK y posterior co-incubación con 0,3 μ M de ouabaina durante 4 h adicionales (tiempo al que habíamos observado previamente activación de esta caspasa), revierte significativamente la activación de la caspasa-9 (13451 RLU/s), hasta llegar a valores similares al control (12790 RLU/s), muy por debajo de los inducidos por la ouabaina en este caso (24929,4 RLU/s). El control positivo de activación de caspasas y de apoptosis, estaurosporina a 1 μ M durante 5 h, incrementó de forma significativa los valores de caspasa-9 (39864,2 RLU/s) con respecto a los que presentaban las células en condiciones basales, como cabía esperar (n=6).

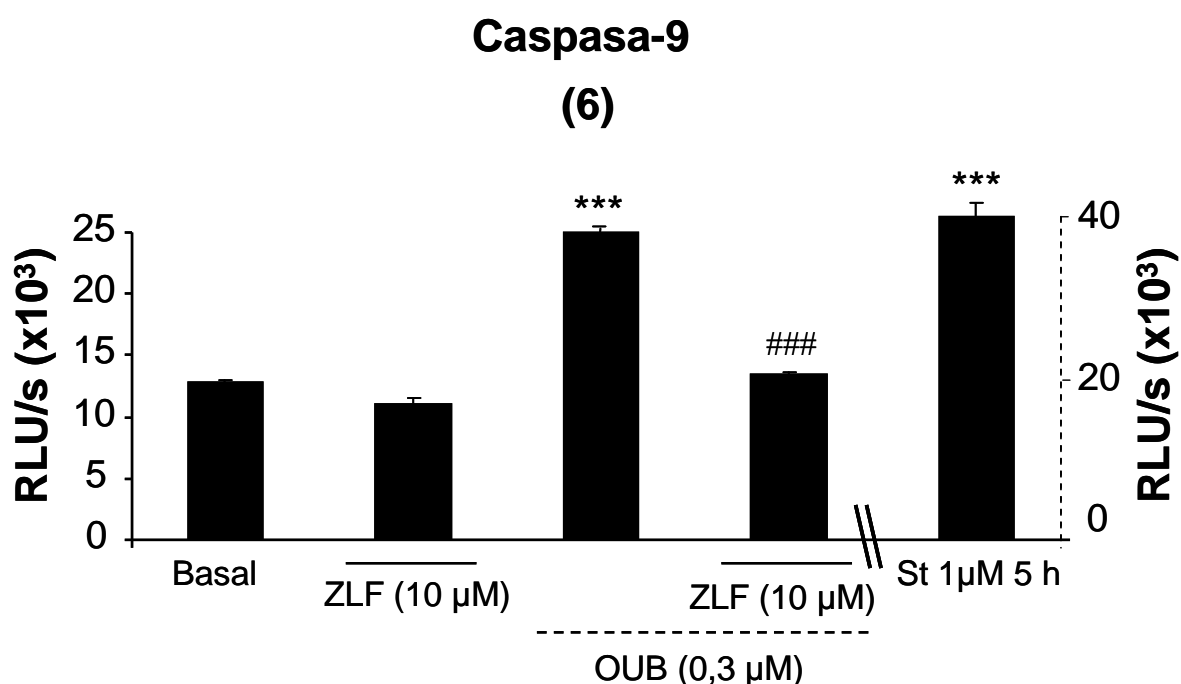


Figura 54. Efectos de la co-incubación del compuesto Z-LEHD-FMK (ZLF) y ouabaina (OUB) sobre la caspasa-9. En la ordenada se representan las unidades relativas de luminiscencia por segundo (RLU/s), que se correlacionan directamente con la cantidad de caspasa-9 activa, y en la abscisa los distintos tratamientos empleados. El antagonista de capasa 9 Z-LEHD-FMK induce unos valores de activación de caspasa-9 silmilar al control (basal). Su co-incubación con OUB 0,3 µM revierte significativamente la activación de la caspasa-9 (13451 RLU/s) con respecto a la producida por el digitálico sólo (24929,4 RLU/s). Como control positivo de apoptosis y de activación de caspasa-9 se empleó estaurosporina (St) a 1 µM durante 5 h que elevó sus valores de activación hasta 39864,2 RLU/s). Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 6 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $p < 0,001$ respecto a la basal y ### $p < 0,001$ respecto a la OUB 0,3 µM.

RESULTADOS

El siguiente experimento planteado con el antagonista de la caspasa-9 Z-LEHD-FMK, tenía como objetivo determinar si ésta inhibición de la activación de la caspasa-9 observada se traducía también en una inhibición de la apoptosis. Procedimos a su estudio y cuantificación mediante citometría de flujo, tal y como hicimos en los experimentos iniciales de este trabajo.

La **figura 55** muestra que tras la incubación de las células durante 24 h con Z-LEHD-FMK a la concentración de 10 μM (aunque también lo hemos observado con las concentraciones de 20, 50 y 100 μM) no resulta tóxica en nuestro modelo, mostrando valores de apoptosis similares a los encontrados en la situación control (<5%). Su preincubación durante 24 h seguida de una co-incubación durante otras 24 h adicionales (tiempo al que se produce y cuantificamos la apoptosis ouabaínica) con 0,3 μM de nuestro digitálico, disminuye un 45% la toxicidad producida con respecto a la de la ouabaína sola (cuantificada en un 40 %) hasta un valor de apoptosis del 23,2 % (n=8).

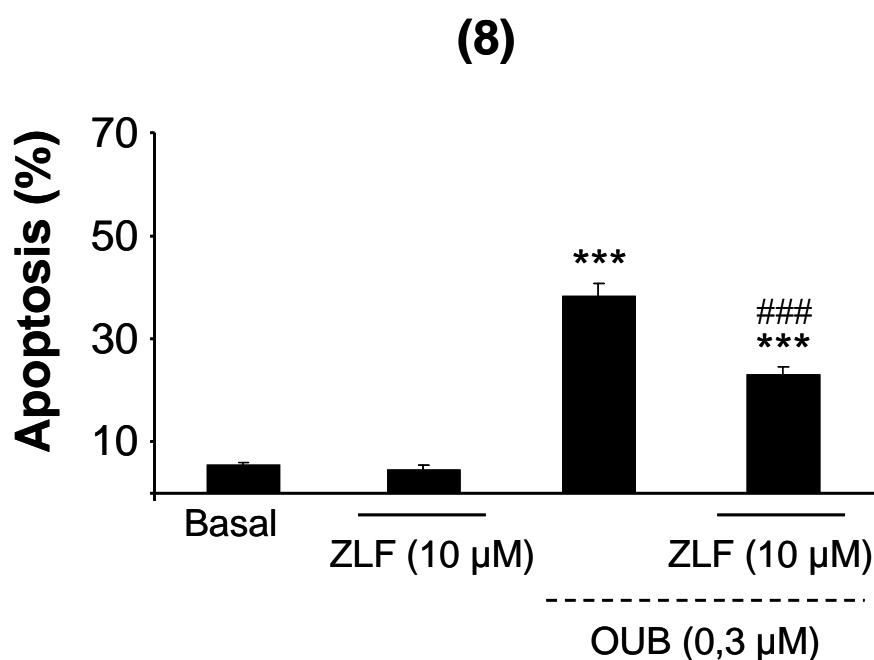


Figura 55. Efectos de la co-incubación del compuesto Z-LEHD-FMK (ZLF) y ouabaína (OUB) sobre la apoptosis celular. La ordenada representa los valores de apoptosis (%) obtenidos y la abscisa los tratamientos empleados. El compuesto ZLF no incrementa la apoptosis con respecto al control (basal) mostrando ambos unos valores <5%. La co-incubación con OUB revierte un 45% la apoptosis con respecto a la producida por el digitalítico solo, hasta un valor de la misma del 23,2%. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 8 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $P < 0,001$ respecto a la basal y ### $p < 0,001$ respecto a la OUB 0,3 μ M.

Los resultados obtenidos con el antagonista de la caspasa-9, junto con los obtenidos previamente de activación de caspasas-3/7 y 9, señalan de nuevo a la mitocondria como un componente esencial en

el proceso apoptótico inducido por la ouabaína en las células HeLa. Por este motivo, decidimos explorar más detalladamente su implicación en el daño celular que el digitálico produce en nuestro modelo.

7. Efectos de la ouabaína en la energética celular.

Determinación de los niveles celulares de ATP

Las mitocondrias son organelas celulares encargadas de suministrar la energía necesaria para la actividad celular; actúan como centrales energéticas sintetizando el ATP necesario para mantener el equilibrio bioenergético. Los tóxicos pueden dañarlas comprometiendo la síntesis de ATP y por ende la cantidad de energía disponible.

Hasta este momento nuestros datos apuntaban a la mitocondria como parte importante en la apoptosis ouabaínica. Basándonos en esto, nuestros esfuerzos se dirigieron a determinar los posibles cambios en los niveles celulares de ATP que pudieran surgir de la toxicidad del digitálico.

La **figura 56** representa la significativa depleción en el contenido celular de ATP que sufren las células HeLa tras su exposición a 0,3 μ M de ouabaína. Durante 2, 3, 4 ó 5 h la concentración celular de ATP disminuye hasta alcanzar valores remanentes en la célula del 59,4, 58,4, 56,9 y 64,50% respectivamente, que son significativamente menores que

RESULTADOS

el control (basal) (considerado del 100%). Una vez más el control positivo de daño celular, estaurosporina a 1 μ M durante 5 h, redujo el contenido de ATP hasta el 1,82 % con respecto al contenido basal, alcanzando la significación estadística (n=9).

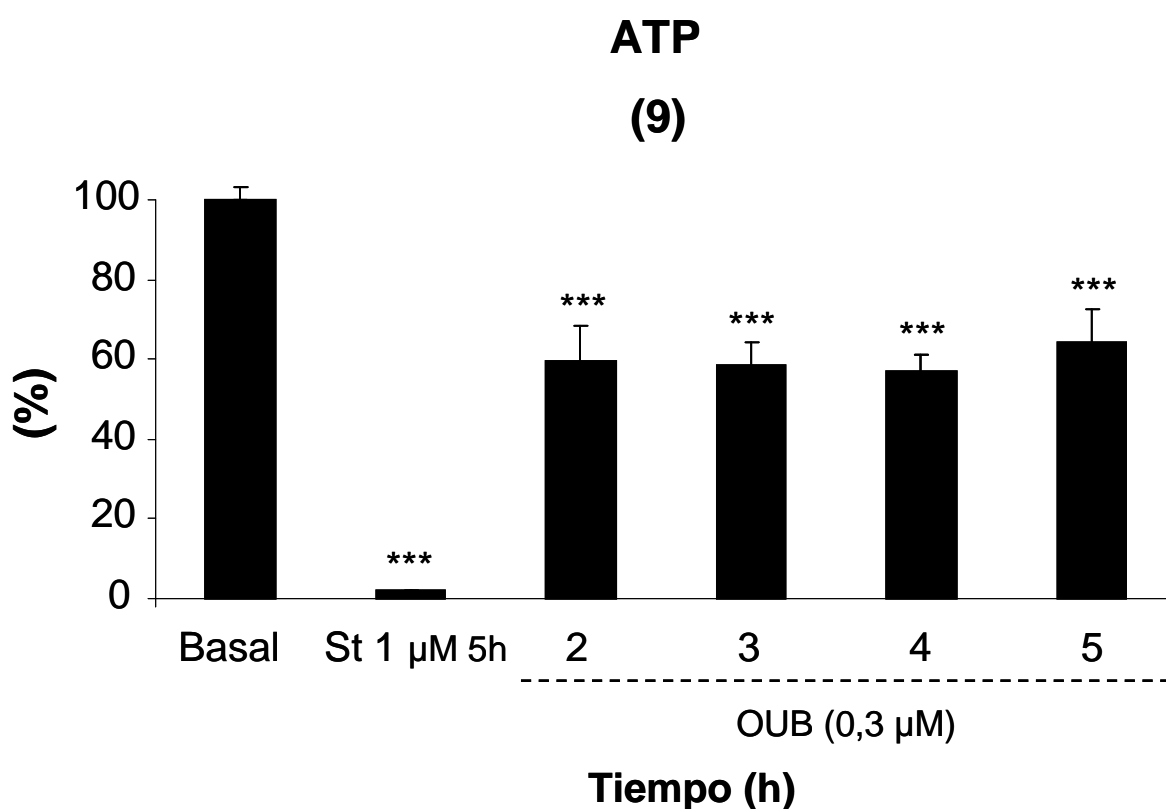


Figura 56. Efectos de la ouabaina (OUB) sobre los niveles de ATP en las células HeLa. En la ordenada se representa el contenido celular de ATP (%) y en la abscisa los distintos tratamientos empleados. La OUB disminuye significativamente, alrededor de un 40%, el contenido celular de ATP con respecto al control (basal). El control positivo estaurosporina (St) 1 μ M durante 5 h depletó casi por completo el ATP, dejando un remanente del 1,82% con respecto al 100% del control. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 9 experimentos. Dentro de cada experimento, cada medida se realizó por cuadruplicado. *** $P < 0,001$ respecto a la basal.

Los datos obtenidos de estos experimentos que manifiestan un menor contenido celular de ATP, junto con los que ya contábamos que mostraban una viabilidad y funcionalidad mitocondrial disminuidas acompañadas de una clara activación de la caspasa-9, confieren a la mitocondria un papel relevante en la toxicidad ouabaínica observada en las células HeLa. Para documentar mejor esta suposición, planteamos estudios de microscopía confocal, encaminados a determinar si la ouabaína sufría un proceso de internalización, una vez que había establecido contacto con la célula. De ser esto afirmativo, podríamos ver también hacia qué lugar del interior celular se dirigía.

8. Localización celular de la ouabaína

La ouabaína se ha considerado tradicionalmente un fármaco que actúa a nivel de la membrana plasmática. Si bien es una molécula de naturaleza esteroidea, su estructura comprende varios grupos polares que le confieren una marcada hidrosolubilidad y hacen que no pueda atravesar por sí misma la membrana plasmática y actuar sobre dianas intracelulares. El único receptor/diana conocido para esta molécula es la bomba de sodio del plasmalema, si bien recientes estudios han descrito lugares de unión intracelulares para glicósidos cardiotónicos, que podrían actuar como receptores potenciales para la ouabaína. Por otro lado se ha descrito un fenómeno de internalización de la

RESULTADOS

bomba Na^+/K^+ ATPasa promovido por ouabaína que requiere de un mecanismo endocitótico (Lin y col., 2005).

Nuestro siguiente planteamiento fue observar el patrón de unión de la ouabaína a la bomba Na^+/K^+ ATPasa para determinar hacia qué diana celular se dirigía. Para la realización de este estudio empleamos una ouabaína fluorescente de color verde llamada "ouabaína-BODIPY FL" que en las condiciones adecuadas y mediante el empleo de un microscopio confocal nos permitiría ver la localización del digitálico en todo momento.

La fotografía de la **figura 57** muestra que tras incubar las células con $0,3 \mu\text{M}$ de ouabaína-BODIPY FL durante 24 h, ésta había accedido al interior celular. Para ver en qué momento se producía esta internalización, se realizaron experimentos *in vivo* de 24 h de duración con registros continuos de las imágenes. Los resultados mostraban que 2 h después de la exposición de las células a la ouabaína-BODIPY FL, ésta se encontraba en la superficie celular distribuída a lo largo de toda la membrana plasmática en forma de microdominios donde la concentración del digitálico era mayor. A medida que el tiempo de exposición aumentaba, la cantidad de ouabaína fluorescente localizada en la membrana plasmática también era mayor. Finalmente, tras 6-8 h de incubación, la ouabaína-BODIPY FL aparece ya en el interior celular. Ni la preincubación con genisteína ($1 \mu\text{M}$), un inhibidor de la vía rápida de la endocitosis mediada por dinamina, ni con

RESULTADOS

cloroquina (100 μM), un inhibidor de la vía lenta de la endocitosis vía clatrina, ni con dinasore (50 μM) revirtieron la internalización de la ouabaína.

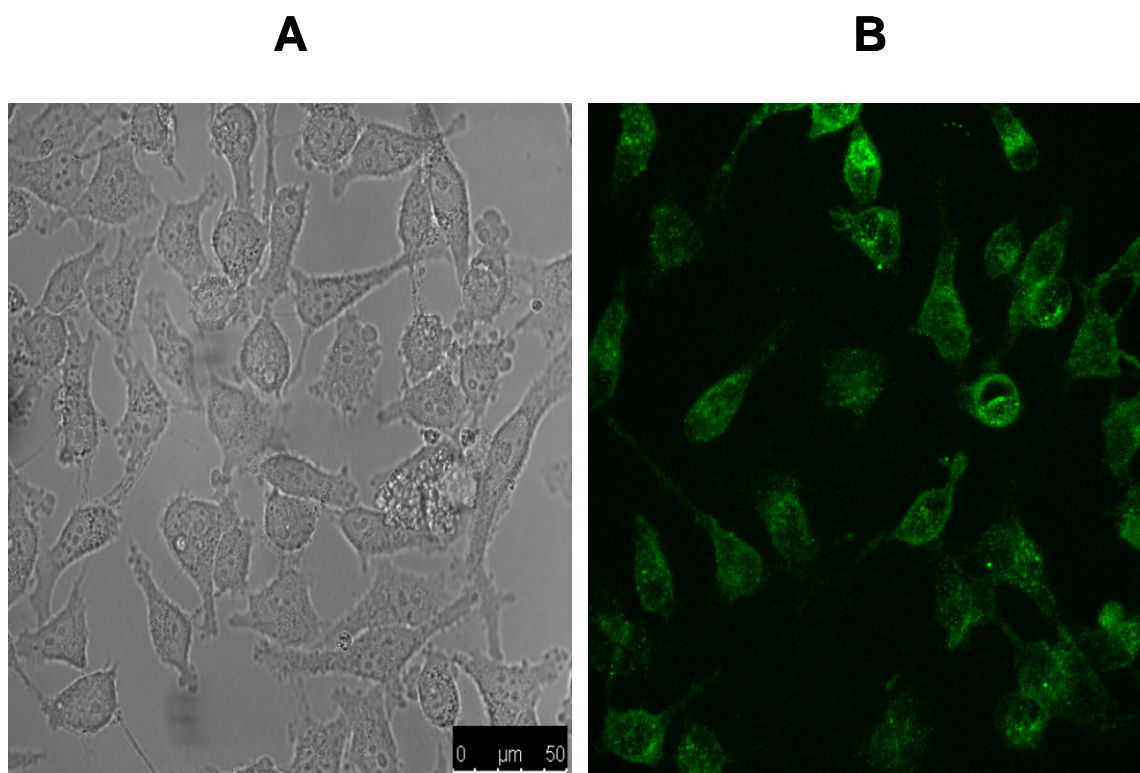


Figura 57. Imágenes de las células HeLa incubadas con un derivado Bodipy de la ouabaina, visualizada con microscopía confocal. La fotografía A corresponde a unas células control y la B a unas células tratadas con 0,3 μM de ouabaína-BODIPY FL verde durante 24 h. Se aprecia que a este tiempo la ouabaina se encuentra distribuída en todo el interior celular. Estos experimentos se realizaron por triplicado empleando tres cultivos celulares distintos.

Tras observar que la ouabaína se internalizaba en la célula, nuestro siguiente objetivo fue determinar hacia qué organela celular se

RESULTADOS

dirigía. Para ello planteamos algunos experimentos de co-localización. Empleamos sondas fluorescentes de color rojo, para marcar cada una de las organelas de interés, y así poder diferenciarlas de la ouabaína-BODIPY FL verde. En el caso de existir co-localización, veríamos esa región celular de un color similar al amarillo.

La primera de las sondas empleadas fue ER-Tracker para marcar el RE (**Figura 58**). Las células se marcaban con la ouabaína fluorescente verde (Figura 58A) y con la sonda roja del RE (Figura 58B). Con el fin de ver si había o no co-localización en esta organela, se superpusieron las imágenes anteriores (Figura 58C). El resultado de esta superposición mostraba unas células con zonas de color verde, correspondientes a la ouabaína-BODIPY FL, rojo, correspondientes a la sonda ER-Tracker que marca el RE, y algunas, muy escasas, amarillas (por la co-localización de ambas). Estos experimentos se realizaron por triplicado empleando tres cultivos celulares distintos.

A la luz de estos datos, la co-localización de la ouabaína-BODIPY FL en el RE no parecía ser significativa.

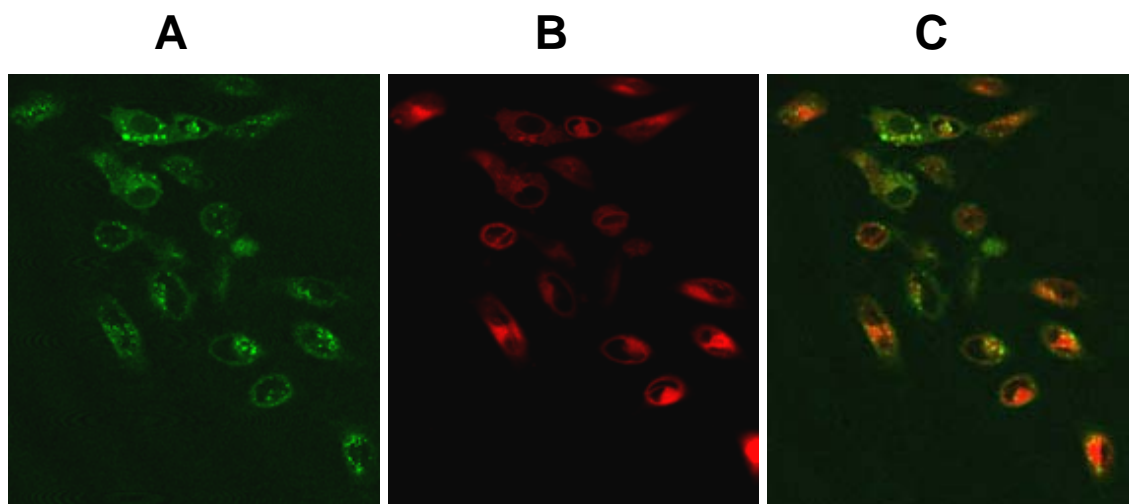


Figura 58. Localización de la ouabaina en las células HeLa incubadas con un derivado Bodipy de la misma, visualizada con microscopía confocal. La fotografía A corresponde a células tratadas con 0,3 μ M de ouabaina-BODIPY FL de color verde durante 24 h. La ouabaina se observa en el interior celular. La fotografía B corresponde al marcaje del RE de las mismas células con la sonda roja ER-Tracker. La fotografía C corresponde a la superposición de las imágenes A y B. Nótese el doble marcaje verde y rojo que presentan las células y la ausencia casi total del color amarillo correspondiente a la co-localización. Se realizaron 3 experimentos en tres cultivos celulares diferentes.

La segunda de las sondas elegidas fue TMRE de color rojo para marcar la mitocondria (**Figura 59**). La figura 59A corresponde a células marcadas con ouabaina-BODIPY FL verde y la figura 59B a las mismas células en las que se han marcado las mitocondrias con la sonda roja TMRE. Al superponer las dos imágenes anteriores el resultado que

RESULTADOS

obtuvimos mostraba una co-localización muy patente de la ouabaína-BODIPY FL en estas organelas celulares (Figura 59C). Estos experimentos se realizaron por triplicado empleando tres cultivos celulares distintos.

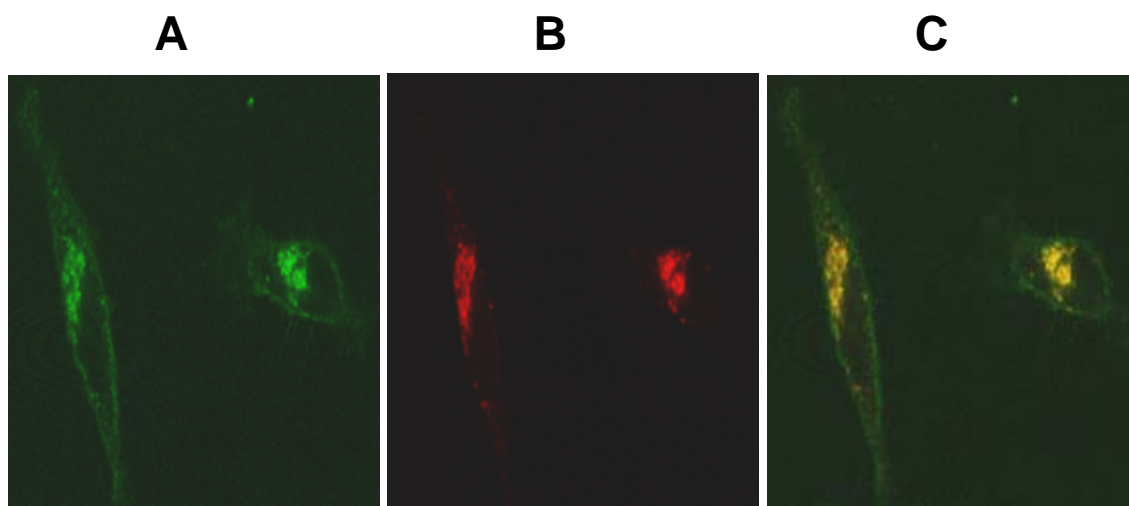


Figura 59. Localización de la ouabaina en las células HeLa incubadas con un derivado Bodipy de la misma, visualizada con microscopía confocal. La fotografía A corresponde a unas células tratadas con 0,3 μ M de ouabaína-BODIPY FL de color verde durante 24 h. Se aprecia que la ouabaína pasa al interior celular. La fotografía B corresponde al marcaje de las mitocondrias de las mismas células con la sonda TMRE de color rojo. La fotografía C corresponde a la superposición de las imágenes A y B. Nótese el color amarillo que presentan las células, correspondiente a la marcada co-localización de la ouabaína en las mitocondrias. Se realizaron 3 experimentos en tres cultivos celulares diferentes.

Teniendo en cuenta estos resultados, disponemos de un argumento más para afirmar que la ouabaína está ejerciendo su acción citotóxica

y poniendo en marcha la maquinaria apoptótica en las células HeLa, a través de un daño mitocondrial del cual la célula no puede recuperarse y finalmente muere.

9. Efecto de la ouabaína sobre el potencial de membrana mitocondrial

Tras el daño celular producido por un agente tóxico que compromete la viabilidad celular a través de la mitocondria, se producen cambios a nivel de esta organela entre los que cabe destacar un cambio morfológico con pérdida de la estructura reticular característica, despolarización y disminución del contenido celular de ATP con compromiso de la energética celular, apertura del poro de transición mitocondrial, salida del citocromo c al citosol y activación de la caspasa-9.

Para comprobar si la exposición a ouabaína estaba alterando la estructura de las mitocondrias, decidimos marcarlas, tras el tratamiento con el digitálico, empleando una sonda potenciométrica fluorescente verde específica para las mismas llamada Green MitoTracker. Los tiempos máximos elegidos de exposición al digitálico fueron los mismos a los que habíamos observado activación de caspasas y depleción del ATP celular.

RESULTADOS

La **figura 60** muestra que tras 1 h de incubación con 0,3 μM del digitálico (panel B) la morfología y distribución reticular de las mitocondrias permanece similar a la que presentan las células control, que no han sido sometidas a tratamiento alguno (panel A). A las 3 h de exposición a 0,3 μM de ouabaína (panel C), el aspecto de las mitocondrias es notablemente distinto al que presentan en las células sin tratar. Las mitocondrias pierden su morfología y distribución características y parecen agregadas en determinadas zonas citosólicas. Además no pueden retener en su interior a la sonda potenciométrica que sale al citosol, confiriendo a la célula un aspecto mucho más borroso que el propio de una célula sana. Estos experimentos se realizaron por triplicado empleando tres cultivos celulares distintos.

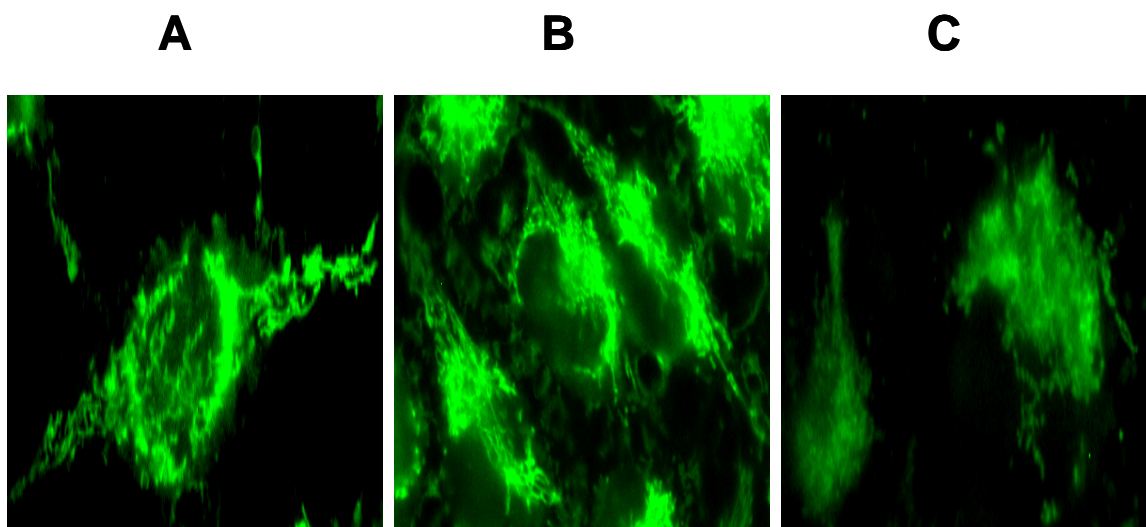


Figura 60. Imágenes de células HeLa marcadas con la sonda mitocondrial Green MitoTracker. La imagen A corresponde a células control. La morfología mitocondrial no muestra alteraciones, su distribución es homogénea y reticular propia de las células sanas. Las imágenes B y C corresponden a células HeLa tratadas con ouabaína a 0,3 μM durante 1 y 3 h respectivamente. La primera de ellas corresponde a 1 h de exposición al digitálico, pero no muestra diferencias muy notables con respecto al control. La segunda muestra que tras 3 h de incubación, la ouabaína modifica de forma muy llamativa la morfología y distribución mitocondrial, con respecto a la observada en las células control. Las mitocondrias pierden su estructura reticular característica y aparecen agregadas en determinadas zonas citosólicas. Además se aprecia la salida de la sonda desde el interior mitocondrial al citosol, lo que confiere a la célula un aspecto más borroso.

Esta salida de la sonda puede tener lugar, tras la despolarización de la mitocondria, a través de la apertura del poro de transición mitocondrial por el que también sale el citocromo c (Cai y col. 1998; Du

y col., 2000; Loo y col., 2002; Garrido y col., 2005), desencadenando la cascada apoptótica. Tras la unión de éste al factor activador de la apoptosis, Apaf-1, y la formación del complejo conocido como *apoptosoma* (Cain y col., 1999), se produce la activación de la “vía intrínseca” de la apoptosis vía caspasa-9. Ésta caspasa iniciadora una vez activa, sería a su vez la encargada de activar a las caspasas efectoras de la apoptosis 3 y 7. Tanto la caspasa-3 como el citocromo c pueden actuar sobre el InsP_3R . La primera rompiéndolo en una zona concreta, por lo que éste receptor actuaría como un canal de goteo para el calcio (Hirota y col., 1999; Assefa y col., 2004; Szlufcik y col., 2006), y el segundo uniéndose a él provocando una amplificación de la apoptosis mediada por éste ión (Boehning y col., 2003; Boehning y col., 2004; Liu y col., 2010).

Apoyándonos en estos antecedentes, nos planteamos estudiar las posibles alteraciones en la concentración citosólica de Ca^{2+} que la ouabaína pudiera provocar en nuestro modelo.

10. Efectos de la ouabaína sobre el citocromo c

Los resultados obtenidos hasta este momento parecían involucrar a la mitocondria en la toxicidad inducida por la ouabaína en las células HeLa. Por este motivo nos pareció interesante estudiar si las mitocondrias

RESULTADOS

sufrían algún tipo de redistribución tras la exposición al digitálico y si había o no liberación del citocromo c desde el espacio intermembrana de las mitocondrias al citosol. Para la realización de estos experimentos se realizó una inmunofluorescencia para cuantificar la cantidad de citocromo c y estudiar la morfología mitocondrial en células control y en células tratadas durante 4 h con 0,3 μ M del digitálico.

Los resultados se recogen en la **Figura 61**. Las células tratadas mostraban una distribución mitocondrial muy diferente a la de las células exentas de tratamiento. Las células control (figura 61A), muestran el aspecto característico de las células sanas, con las mitocondrias formando un claro entramado reticular, bien definido en su forma y distribución. Por el contrario, las células expuestas al digitálico (figura 61B), muestran una distribución de estas organelas claramente distinta. Han perdido su estructura reticular clara y definida para colocarse alrededor del núcleo formando anillos de aspecto compacto. Además, aparecen también con un aspecto mucho más difuso. Por su parte, la cuantificación del citocromo c en las mitocondrias (figura 61C) reveló una disminución significativa del mismo en las células expuestas al digitálico valorada en un 64,7% con respecto a las células control considerada del 100%. Concretamente, el contenido de citocromo c remanente en las mitocondrias de las células tratadas fue de un 35,3% (n=4).

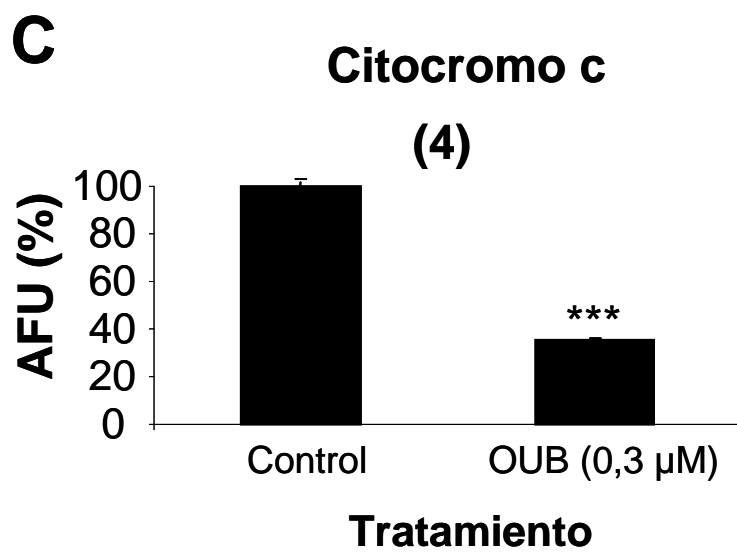
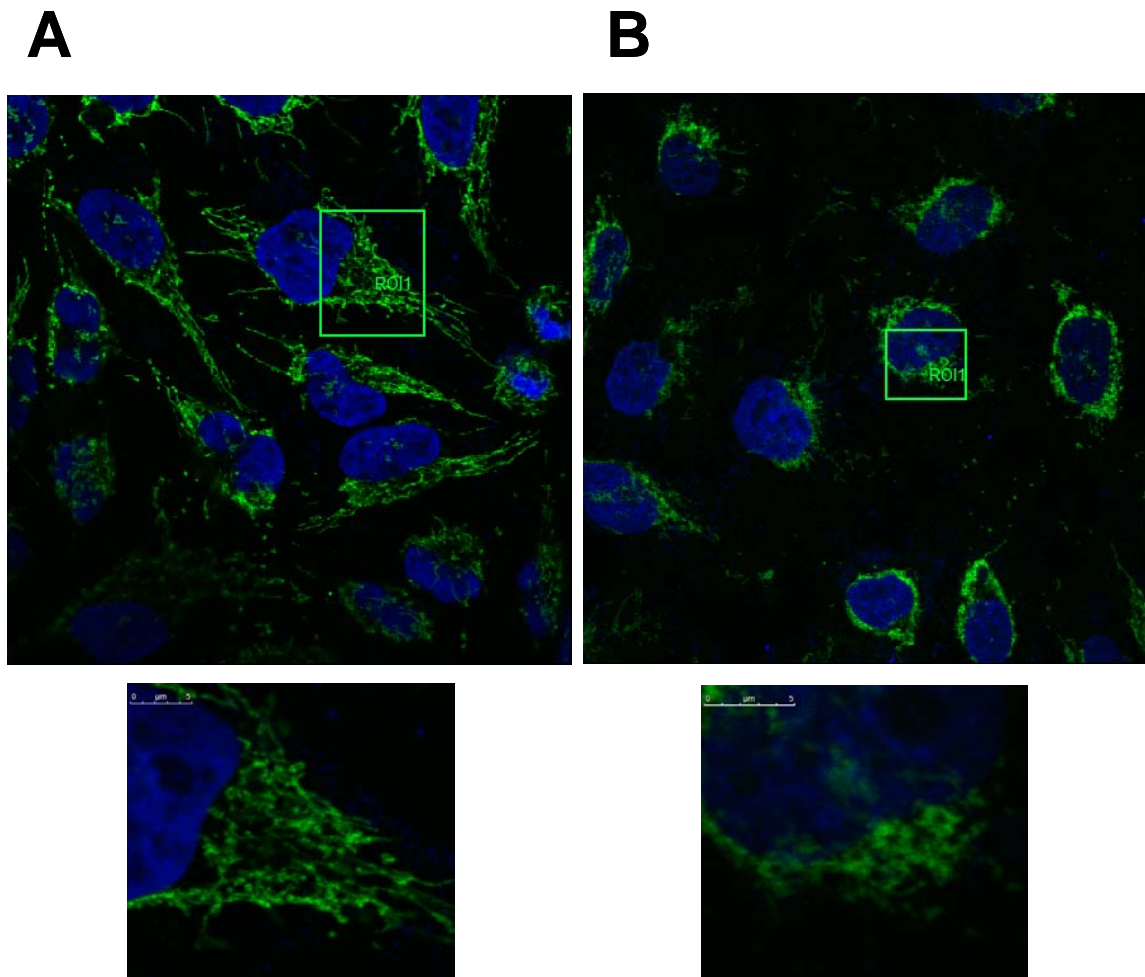


Figura 61. Efecto de la ouabaína (OUB) sobre la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol. Las imágenes A y B corresponden a fotografías del marcaje del citocromo c, empleando anticuerpos específicos. La imagen A corresponde a células control en las que la red mitocondrial típica se mantiene intacta y clara, propia de las células sanas. La imagen B corresponde a células tratadas con ouabaína a 0,3 μM durante 4 h. Obsérvese cómo en las células tratadas hay una redistribución de las mitocondrias que se disponen compactamente alrededor del núcleo, formando un anillo. Se pierde así la estructura reticular clara, típica de las células sanas, y aparece una mucho más punteada y difusa. El citosol también se modifica y adopta un aspecto más borroso. La figura C corresponde a la cuantificación de citocromo c en las mitocondrias. Cabe destacar que las células expuestas al digitálico sufren un significativo descenso (del 64,7%) en la cantidad de citocromo c contenida en sus mitocondrias, lo que indica una redistribución del mismo y su salida al citosol. Los datos son las medias \pm las desviaciones estándar de 4 experimentos. Las determinaciones se realizaron en al menos tres cultivos diferentes. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

11. Efectos de la ouabaína sobre la concentración citosólica de calcio

Si la ouabaína está alterando la homeostasia reticular del Ca^{2+} a través de la ruptura del receptor de InsP_3 , esto debería reflejarse en una alteración en su patrón de liberación. Para averiguar si esto sucedía realmente, realizamos medidas de Ca^{2+} en el citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) tras la exposición a ouabaína a 0,3 μM durante 6 h.

RESULTADOS

Tal y como hemos visto anteriormente, la ouabaína activa la caspasa-3 tras exposiciones cortas al digitálico. Cuando la caspasa-3 está activa, ésta puede romper el InsP_3R del RE, que funcionaría como un "*leak channel*" o canal de goteo, provocando una salida constante de Ca^{2+} desde el RE al citosol (Hirota y col., 1999; Assefa y col., 2004; Szlufcik y col., 2006). Como la activación de caspasa-3 la hemos observado a tiempos cortos de incubación con el digitálico (3, 4 y 5 h), decidimos hacer este estudio de medidas de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ tras 6 h de incubación de las células con ouabaína, tiempo al que las caspasas-3/7 y 9 ya estarían activas. Algo parecido sucede con el citocromo c, que amplifica la señal de Ca^{2+} durante el proceso apoptótico a través de su unión al InsP_3R del RE (Boehning y col., 2003; Boehning y col., 2004; Liu y col., 2010).

La **figura 62** muestra elevaciones de la concentración citosólica de calcio, medidas con la sonda de cocientes fura-2 AM, tras un pulso de histamina a 100 μM durante 30 s. La incubación previa de las células con ouabaína a 0,3 μM durante 6 h, produjo una elevación del calcio citosólico inducida por histamina significativamente inferior a la medida en condiciones control. Esto se traduce en una altura de los picos de un 45,7 % y de un área bajo la curva (amplitud de los picos) de un 28,7 % con respecto al 100 % de las controles. Además de tener unos picos de calcio significativamente menores, tanto en altura como en amplitud, el

RESULTADOS

número de células tratadas que responde al pulso de histamina es del 20% con respecto a las células control (considerada el 100%).

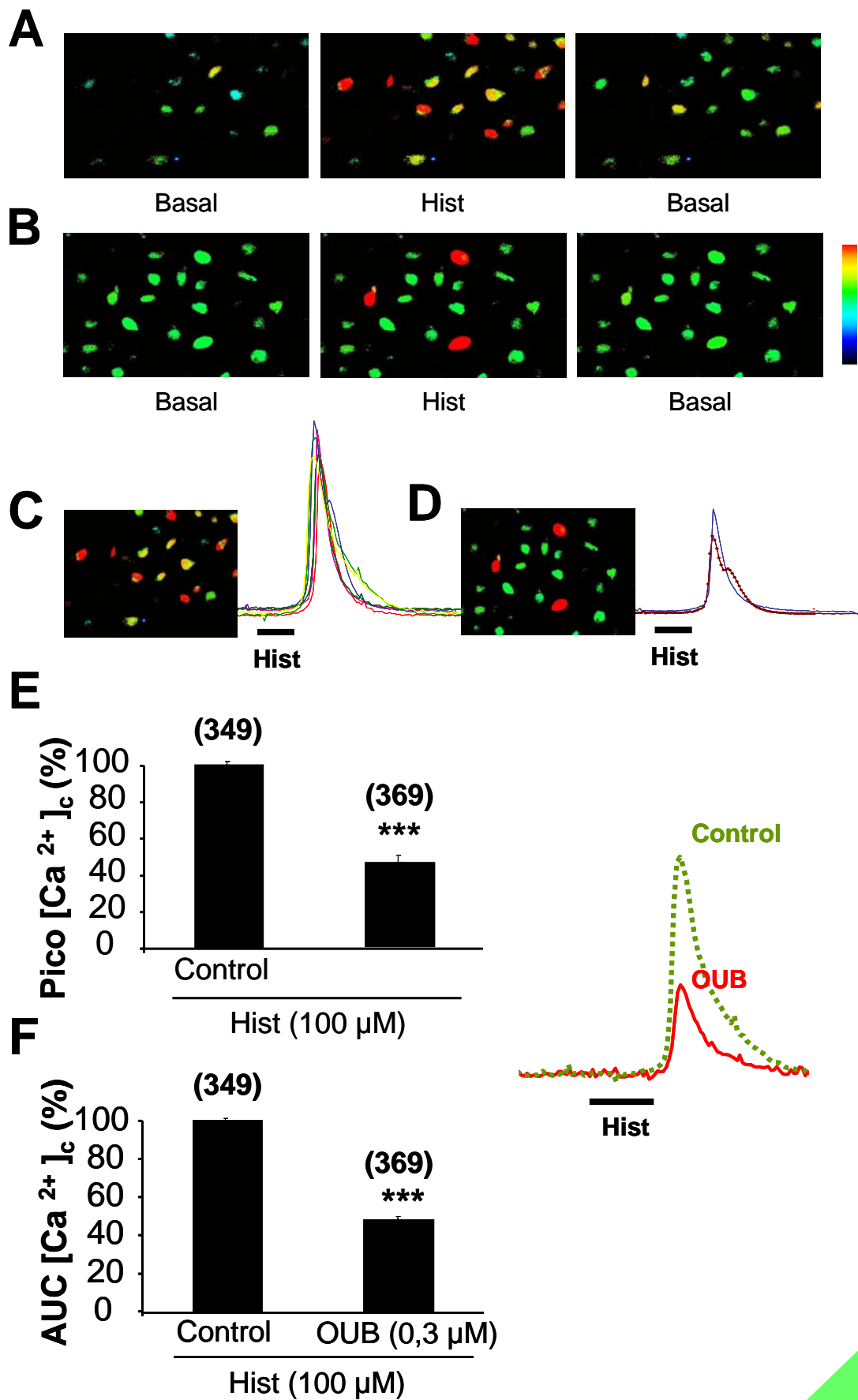


Figura 62. Efecto de la ouabaína sobre la concentración citosólica de calcio ($[Ca^{2+}]_c$) medida con la sonda fura-2 AM. Los paneles A y B muestran imágenes de las células tomadas a tres tiempos distintos. Antes del pulso de histamina 100 μ M de 30 s (basal), durante el pulso (Hist) y una vez finalizado cuando las células recuperan el estado basal (basal). La escala colorimétrica de la derecha indica los incrementos en la $[Ca^{2+}]_c$. El panel A corresponde a unas células control que no han recibido tratamiento alguno. Prácticamente todas ellas responden al pulso de histamina. El panel B corresponde a unas células tratadas con ouabaína a 0,3 μ M durante 6 h. Nótese como el número de células que responden a histamina es sustancialmente menor. Los paneles C y D corresponden a un registro representativo de la elevación de la $[Ca^{2+}]_c$ observada tras un pulso de histamina en las células control y tratadas con ouabaína a 0,3 μ M durante 6 h, respectivamente. Cabe destacar que en el caso de las células tratadas, el número de respondedoras es significativamente inferior al de las controles. Además, los registros obtenidos tanto en altura (panel E) como en amplitud o área bajo la curva (AUC) de los picos (panel F) son significativamente menores en las células tratadas con ouabaína que los observados en las controles. Los datos son la s medias \pm las desviaciones estándar del número de células en paréntesis. Las determinaciones se realizaron en tres cultivos diferentes. *** $p < 0,001$ respecto a la basal.

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos puesto de manifiesto que concentraciones nanomolares del esteroide cardiotónico ouabaína inducen un efecto tóxico en las células HeLa disminuyendo su viabilidad y activando la vía intrínseca de la apoptosis. Esta apoptosis va acompañada de una disminución en el contenido celular de ATP, de una despolarización mitocondrial y de la salida del citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial al citosol, además de un cambio en la distribución reticular característica de las mitocondrias. El tratamiento con el digitálico induce una alteración en el pico de Ca^{2+} citosólico inducido por un pulso con histamina, mostrando una altura y un AUC menor que el control.

Este efecto apoptótico ha sido previamente demostrado en células epiteliales renales en los rangos de concentración comprendidos entre 0,05 y 0,5 μM de ouabaína en las que la exposición al digitálico produce daño celular con pérdida de la función mitocondrial y degradación del ADN, independientemente de la razón $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ (Pchejetski y col., 2003). También se ha observado apoptosis en células del endotelio vascular y C7-madin-Darby epiteliales hepáticas caninas en el rango entre 0,004 y 0,05 μM (Akimova y col., 2005). En estas células epiteliales, y en células endoteliales de aorta de cerdo, la toxicidad ouabaínica consiguió revertirse con la acidificación del medio desde un pH 7,4 hasta pH 7,0 posiblemente porque esta acidificación induce la expresión de novo de genes implicados en la inhibición de la

DISCUSIÓN

maquinaria de la muerte celular. Con nuestras condiciones experimentales, la apoptosis sucedió en el rango de concentraciones de ouabaína comprendido entre 0,03 y 100 μM y el efecto dual pro-apoptótico y anti-apoptótico descrito en células de neuroblastoma humano (Kulikov y col., 2007) y en células HeLa (Ramírez-Ortega y col., 2006) no se observó. Ramírez-Ortega y colaboradores emplearon un rango de concentraciones de ouabaína entre 0,01 nM y 10 μM con periodos de incubación que iban desde las 24 h hasta las 96 h. El número de células aumentó con exposiciones a concentraciones de ouabaína menores de 10 nM durante 48 h, mientras que otros inhibidores no esteroideos de la bomba Na^+/K^+ ATPasa no tuvieron este efecto proliferativo. El crecimiento celular de las células tratadas frente al de las células control se evaluó con medidas de la densidad óptica, que es proporcional al número de células. Concentraciones mayores de 10 nM indujeron una muerte celular dependiente del tiempo y la concentración. Parece que el efecto tóxico de los digitálicos está mediado por la inhibición de la bomba Na^+/K^+ ATPasa mientras que el proliferativo es independiente de este mecanismo.

Los parámetros evaluados para estudiar el daño celular fueron la morfología nuclear, la fragmentación del ADN, la liberación del citocromo c y el procesamiento proteolítico de las caspasas- 9 y -3 (Ramírez-Ortega y col., 2006). Estos autores determinaron la apoptosis con 100 nM de ouabaína incubada durante 72 h, empleando la técnica

DISCUSIÓN

de fragmentación del ADN. Estas variaciones en el protocolo y metodología empleadas así como en la concentración y tiempo de exposición al digitálico pueden explicar las diferencias con nuestros resultados, ya que nuestras células HeLa fueron incubadas con concentraciones crecientes de ouabaína (desde 0,03 hasta 100 μM) durante 1, 2, 6, 12, 24 y 48 h no durante 72 h, y la apoptosis resultante se determinó empleando la citometría de flujo.

Que el efecto apoptótico de la ouabaína que hemos demostrado se debe a su gran afinidad por la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática está avalado por dos hechos:

1. La digoxina, cuyo mecanismo de acción media a través de la unión a esta bomba y su consecuente inhibición, también produjo apoptosis en las células HeLa a concentraciones submicromolares (0,3, 1 y 3 μM).
2. La co-incubación de las células con ambos digitálicos a concentraciones supramáximas no indujo una apoptosis mayor que la producida con cada uno de ellos por separado. Esta falta de aditividad en el efecto apoptótico indica que ambos digitálicos comparten un mismo mecanismo de acción.

La bomba Na^+/K^+ ATPasa es una ubicua proteína integral de la membrana que se expresa en las células eucariotas, y que regula las concentraciones intracelulares de iones Na^+ y K^+ hidrolizando ATP (Skou

y col., 1998; Skou y col., 1992; Lingrel y Kuntzweiler 1994). Hasta la fecha la única diana conocida para la ouabaína y otros esteroides cardíacos es la subunidad α de la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Lingrel y col., 1994; Akimova y col. 2005), y la mayoría de los efectos farmacológicos de estos compuestos se deben a la inhibición de la misma. Esta inhibición conduce a un aumento de $[\text{Na}^+]_c$ que favorece la puesta en marcha en modo reverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática, incrementando así la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Esto explicaría el incremento de la fuerza de la contracción del músculo cardíaco producida por los esteroides cardíacos (Blaustein y col., 1993). Este exceso de Ca^{2+} en el citosol es secuestrado en almacenes del interior celular, como el RE o el retículo sarcoplásmico (RS), y así la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ quedaría ligeramente aumentada mientras que lo estaría sustancialmente en el RE o RS, que actuarían entonces como amplificadores de la señal de Ca^{2+} (Blaustein y col., 1993).

Las células HeLa carecen de este intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su membrana plasmática (Furman y col., 1995), por lo que el efecto tóxico que la ouabaína les produce tiene que ser independiente de un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a través de este intercambiador. Numerosos trabajos atribuyen a la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática un papel como transductor de señales tras unir esteroides cardíacos endógenos o exógenos como la ouabaína (Aizman y col., 2001; Miyakawa-Naito y col., 2003). Cuando se produce la unión se

DISCUSIÓN

activan cascadas de señalización que pueden regular la transcripción de numerosos genes, independientemente de cambios en la concentración intracelular de iones Na^+ o K^+ (Liu y col., 2000; Miyakawa-Naito y col., 2003). La bomba puede también interaccionar directamente con proteínas vecinas y con cascadas de señalización para transmitir así la señal ouabaínica a los distintos compartimentos intracelulares (Xie y Cai, 2003).

La afinidad de la bomba Na^+/K^+ ATPasa por los glicósidos cardíacos depende del estado energético en el que se encuentre la bomba y de su conformación (Yoda y Yoda, 1975; Wallick y Schwartz, 1988). En células HeLa la ouabaína ($0,1 \mu\text{M}$) inhibe un 40% el transporte de Na^+ y K^+ a través de la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática (Price y col., 1988). Además la unión de Na^+ o K^+ a la bomba cambia su conformación, provocando que su afinidad por la ouabaína se vea disminuida (Palasis y col., 1996).

El hecho de que en nuestras manos un exceso de Na^+ o de K^+ en el medio no modifique el efecto apoptótico de la ouabaína, y por tanto no sea capaz de desplazar al digitálico de su sitio de unión a la bomba Na^+/K^+ ATPasa, indicaría que la actividad de esta bomba no sería la máxima responsable de la toxicidad ouabaínica y que la unión del digitálico a dicha bomba estaría posiblemente activando una cascada de señalización intracelular que llevaría a la muerte apoptótica de la célula. Una activación similar se ha observado en células de hígado de

rata en los que la ouabaína, tras unirse a la bomba Na^+/K^+ ATPasa, provoca un cambio conformacional de la misma favoreciendo su conexión con el InsP_3R del RE y con la PLC, (Yuan y col., 2005). En células epiteliales renales la ouabaína provoca oscilaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular y la activación de cascadas de señalización intracelular con activación de Ras, proteínas cinasas como MAPK, PI_3K , PKC y especies reactivas de oxígeno (Akimova y col., 2005).

El grupo de Akimova recoge en uno de sus trabajos sus observaciones en células C7 Madin-Darby en las que la ouabaína reduce la viabilidad celular cerca de un 50%, determinada mediante la capacidad de las células para reducir una sal de tetrazolio en una sal de formazán (MTT), y aumenta un 80 % el número de células que se despegan del fondo del pocillo con respecto a las células control (Akimova y col., 2005). En nuestras manos, la ouabaína también disminuye la viabilidad de las células HeLa un 25% con respecto a la de las células que quedan exentas de tratamiento y provoca un cambio morfológico de las mismas que adoptan un aspecto más redondeado y despegado del fondo del pocillo. Akimova y sus colaboradores no consiguieron modificar la toxicidad del digitálico empleando quelantes de Ca^{2+} como el EGTA o el BAPTA, aumentando la $[\text{Ca}^{2+}]_c$, ni interfiriendo en rutas como la de señalización de Ras, MAPK, tirosina cinasas (genisteína). Apuntan a un posible mecanismo apoptótico independiente de elevaciones de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ a través del intercambiador

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática (Akimova y col., 2005), apoyándose en sus resultados y en los publicados por otros investigadores (Pchejetski y col., 2003; Orlov y col., 2004; Akimova y col., 2005). Nosotros tampoco hemos conseguido revertir la toxicidad del digitálico empleando distintas herramientas farmacológicas dirigidas a dianas celulares tradicionalmente ligadas a la apoptosis. Ni con inhibidores de la endocitosis y de tirosina cinasas (como la genisteína), ni empleando quelantes de Ca^{2+} como el EGTA-AM o BAPTA-AM por citar algunos ejemplos. La hipótesis apoptótica independiente del intercambiador Na^+/Ca^+ , postulada por el grupo de Akimova, cobra una especial importancia en nuestro modelo ya que las células HeLa con las que hemos trabajado carecen de este intercambiador en su membrana plasmática (Furman y col., 1995).

La apoptosis es un proceso cuidadosamente regulado, dependiente de energía, caracterizado por cambios morfológicos y bioquímicos específicos, en los que la activación de las caspasas juega un papel fundamental. Aunque muchas de las proteínas claves que están activadas o inactivadas en la apoptosis ya han sido identificadas, el mecanismo molecular de acción o activación de estas proteínas no se conoce detalladamente y son objeto de un constante estudio. La importancia de conocer la maquinaria de la apoptosis es vital porque la muerte celular programada ocurre tanto en la salud como en la

DISCUSIÓN

enfermedad, y se inicia tanto por estímulos fisiológicos como patológicos.

Hasta la fecha hay más de 13 caspasas conocidas (procaspasas o caspasas activas) que pueden detectarse empleando diferentes métodos una vez que la apoptosis se ha iniciado (Gurtu y col, 1997). Nosotros abordamos el estudio de la apoptosis profundizando en las dos vías principales implicadas en su activación, la vía intrínseca y la vía extrínseca, para ver si la ouabaína mediaba su efecto tóxico a través de alguna de ellas o de ambas (Crompton, 1999). Para ello determinamos los niveles de activación de las caspasas relacionadas con cada una de ellas (Zeiss, 2003).

La vía extrínseca implica que un receptor situado en la membrana plasmática, tras unir un ligando tóxico, inicia una cascada de señalización que activa una proteasa conocida como caspasa-8 que a su vez activa a las caspasas efectoras de la apoptosis -3 y -7. Por otra parte, la participación de la vía intrínseca de la apoptosis implica un daño mitocondrial reflejado en la activación de la caspasa-9 iniciadora del proceso apoptótico, y la posterior activación proteolítica de las caspasas efectoras -3 y -7 por parte de la caspasa-9 activa (Elmore, 2007; Zeiss, 2003). La activación de una u otra vía depende principalmente del tipo de estímulo tóxico, del tiempo de exposición al mismo y del tipo celular (Yoshida y col., 1998). Como hemos mencionado, ambas vías convergen en una misma vía ejecutora que se

pone en marcha con la activación proteolítica de la pro-caspasa-3 que da lugar a la caspasa-3 activa que a su vez activa otras caspasas ejecutoras como la -7. En nuestras manos, la ouabaína no activó la caspasa-8 en las células HeLa, lo que indica que esta vía no está implicada en la toxicidad ouabaínica que hemos observado en nuestro trabajo. La caspasa-9 sin embargo sí se encontraba activada con respecto al valor que mostraban las células control, dato que apoya la existencia de un daño mitocondrial provocado por la exposición de las células al digitálico. Ramírez-Ortega y sus colaboradores hicieron la misma observación en células Hela tratadas con distintos digitálicos, entre ellos 70 nM de ouabaína durante 72 h. Para ello emplearon la técnica de inmunoblot y determinaron en extractos citosólicos celulares la existencia de fragmentos menores de 32kDa de procaspasa-3 y de 49 kDa de procaspasa 9. Con la observación de estos fragmentos confirmaron la activación parcial de la caspasa-3 y total de la caspasa-9 en las células tratadas (Ramírez-ortega y col., 2006). Nosotros hemos observado que en nuestro modelo la ouabaína activa la caspasa-9 y que ésta a su vez activa a las caspasas efectoras -3 y -7 quienes en última instancia llevan a la célula a morir por apoptosis. Estos datos los confirma el hecho de que el compuesto Z-LEHD-FMK, un antagonista selectivo de la caspasa-9, revierte tanto la activación de la caspasa-9 como la apoptosis resultado de su activación.

DISCUSIÓN

Entre las funciones de la mitocondria está el mantenimiento de la homeostasia del Ca^{2+} , la síntesis de grupos hemo, urea, precursores de nucleótidos, ácidos grasos y la más destacada, la síntesis del combustible energético celular, el ATP. La puesta en marcha de la apoptosis disminuye el contenido celular de ATP el cual es absolutamente necesario para el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial y para la supervivencia celular. Puesto que en nuestras observaciones la ouabaína disminuía a la mitad el contenido celular de ATP en las células HeLa, era de esperar que una disfunción de la capacidad bioenergética celular estuviera teniendo lugar durante el proceso apoptótico. Esta suposición se sustentaba en la observación de que la ouabaína alteraba la distribución reticular característica de las mitocondrias de las células expuestas a ella, como reveló su marcaje con la sonda Green Mitotracker. Esta sonda permeable entra en las células por difusión pasiva y es retenida selectivamente en las mitocondrias de las células vivas. Tras el tratamiento con el digitálico las mitocondrias aparecían con un aspecto muy difuso en zonas celulares más delimitadas y el citoplasma mostraba una apariencia punteada y borrosa que no tenían las células control, probablemente porque las mitocondrias no pudieron mantener la sonda en su interior y la expulsaron al citosol. Estas dos observaciones podrían ser el resultado de la apertura del poro de transición mitocondrial.

DISCUSIÓN

Cuando el poro se abre, se altera el potencial de membrana mitocondrial y se liberan al citosol el citocromo c (Cai y col. 1998; Du y col., 2000; Loo y col., 2002; Garrido y col., 2005), la procaspasa-9 (Crompton y col., 1999) y otras proteínas pro-apoptóticas (Smac/DIABLO, serín proteasa HtrA2/Omi) (Saelens y col. 2004). En el citosol el citocromo c se une y activa a Apaf-1 y a la procaspasa-9 formando así el “apoptosoma”, con consumo de ATP (Chinnaiyan, 1999; Hill y col., 2004). Diversos ensayos mitocondriales, entre ellos la liberación del citocromo c, permiten detectar cambios que se producen en las primeras etapas de la vía intrínseca de la apoptosis. Esta salida del citocromo c, puede observarse empleando la microscopía confocal (Bedner y col., 1999) y fluorescencia (Scorrano y col., 2002) y una vez en el citosol se convierte en una molécula muy inestable, por lo que su determinación debe realizarse siempre empleando un control negativo (Goldstein y col., 2000). Una vez en el citosol, el citocromo c puede unirse al InsP₃R del RE provocando un aumento de la conductancia a su través y un mayor transiente de Ca²⁺ que a su vez origina una liberación masiva de citocromo c desde el espacio intermembrana de la mitocondria (Boehning y col., 2003). Como consecuencia, se produce la formación del apoptosoma y la activación de caspasas que conducen a la muerte de la célula.

Nosotros hemos observado que la ouabaína induce una salida del citocromo c hacia el citosol tras pocas horas de exposición al digitálico

DISCUSIÓN

(coincidiendo con el tiempo al que las caspasas -9, -3 y -7 estaban activas), salida que resulta ser un evento crítico en el proceso apoptótico y que se produce una vez que el poro de transición mitocondrial está abierto. A través de este poro también sale la caspasa-9, que activará posteriormente a las caspasas -3, -7. El grupo de Ramírez-Ortega también ha observado esta salida del citocromo c al citosol en las células HeLa expuestas a 70 nM de ouabaína durante 72 h, tiempo al que también vieron una drástica activación de la caspasa -9 y en menor grado de la -3 (Ramírez-Ortega y col., 2006).

Un mecanismo adicional implicado en la apoptosis ouabaínica podría estar ligado a un goteo constante de Ca^{2+} desde RE al citosol a través del InsP_3R fundamentalmente (Miyakawa-Naito y col., 2003; Zhang y col., 2006). Numerosos autores han demostrado que existe un microdominio de contacto físico entre el extremo N-terminal de la subunidad $\alpha 1$ de la bomba Na^+/K^+ ATPasa y el InsP_3R del RE en distintos modelos celulares. Cuando la ouabaína se une a la bomba Na^+/K^+ ATPasa, causando una inhibición parcial de la misma, se produce una salida de Ca^{2+} a través del InsP_3R del RE que ocasiona oscilaciones en la concentración citosólica de este ión, que a su vez conducen a una activación de algunos factores de transcripción como el NF- κ B que puede regular la apoptosis inhibiéndola (Miyakawa-Naito y col., 2003). Modificaciones en el extremo N-terminal de la subunidad α de la bomba Na^+/K^+ ATPasa no modifican la funcionalidad de la misma, ya que sigue

DISCUSIÓN

controlando de forma efectiva los niveles de iones Na^+ y K^+ y sigue uniéndose a la ouabaína, pero sí impiden que se produzcan oscilaciones citosólicas de Ca^{2+} cuando el digitálico se une a su diana (Miyakawa-Naito y col., 2003). Zhang demostró que además de la isoforma $\alpha 1$, las isoformas $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la bomba Na^+/K^+ ATPasa también mantenían un estrecho contacto con el InsP_3R del RE a través de su extremo N-terminal. La unión se produce concretamente en tres aminoácidos muy conservados (LKK) en todas las especies que si se modifican genéticamente pueden atenuar las oscilaciones de Ca^{2+} en el citosol inducidas por la unión de la ouabaína y regular así la apoptosis (Zhang y col., 2006).

Muchos procesos fisiológicos están regulados por cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Uno de los factores que puede alterar esta concentración en el citosol es la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares a través de dos familias de canales, InsP_3Rs y RyRs (Berridge y col., 2003; García y col., 2012). Debido a la gran heterogeneidad de las organelas celulares y a la existencia de mensajeros que promocionan su liberación, se continúa estudiando otras posibles vías de liberación de Ca^{2+} conocidas como “vías de goteo” que contribuyen a regular la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ y la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ (Camello y col., 2002). Existen evidencias de que tanto los InsP_3Rs como los RyRs contribuyen a este goteo de Ca^{2+} , particularmente en situaciones patológicas y durante la apoptosis (Brini y col., 2005; Oakes y col., 2005). Los InsP_3Rs están implicados en numerosas cascadas de

DISCUSIÓN

señalización que conducen a la apoptosis (Hanson y col., 2004). Ha quedado demostrado que el subtipo 1, $\text{InsP}_3\text{R1}$, es sustrato de la caspasa-3 (Hirota y col., 1999; Assefa y col., 2004; Szlufcik y col., 2006) proteasa que juega un papel fundamental en la ejecución de la apoptosis. Sólo este subtipo de receptor tiene un sitio de reconocimiento (Asp-Glu-Val-Asp en los aminoácidos 1888-1891) para la caspasa-3 que lo corta generando un fragmento de 95 kDa en el extremo C-terminal conocido como “canal único” (del inglés “*channel-only*”) que en las células HeLa y COS-7 causa la depleción casi completa del ER por un goteo constante de Ca^{2+} hacia el citosol (Nakayama y col., 2004). Experimentos realizados *in vitro* con $\text{InsP}_3\text{R1}$ mutados, no susceptibles de ser sustratos de la caspasa-3, mostraron una menor sobrecarga de Ca^{2+} en el citosol y una menor apoptosis que los $\text{InsP}_3\text{R1}$ nativos, tras ser sometidos a un estímulo. El vaciamiento de los depósitos intracelulares a través del $\text{InsP}_3\text{R1}$ del RE debido a un goteo constante, y el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ que le sigue, pueden ejercer un efecto de alimentación positiva y acelerador en las últimas fases de la apoptosis, una vez que la caspasa-3 ya está activa (Assefa y col., 2004). O bien, puede ejercer un efecto contrario y anti-apoptótico al disminuir el contenido en Ca^{2+} del RE y por lo tanto disminuir también su captación por la mitocondria cuando el ión se libera al citosol. El ratio de las proteínas pro- o anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 que regulan el estado del $\text{IP}_3\text{R1}$ pueden regular también este goteo de Ca^{2+} desde el ER (Oakes y col., 2005). Este último mecanismo propuesto encierra una gran controversia.

DISCUSIÓN

A esto se suma el hecho de que el citocromo c que sale de la mitocondria al citosol puede unirse al InsP₃R del RE próximo, concretamente en los aminoácidos 2589-2749 de su extremo C-terminal, en las primeras etapas de la apoptosis, provocando una salida constante del Ca²⁺ desde esta organela, que disminuye su concentración de este ión, hacia el citosol. Este incremento de la [Ca²⁺]_c se traduce en una amplificación de la señal apoptótica tanto por el exceso de Ca²⁺ en el citosol como por la amplificación en la liberación de citocromo c que produce (Boehning y col., 2003; Boehning y col., 2004; Liu y col., 2010). Este incremento en la [Ca²⁺]_c provocada por la unión del citocromo c al InsP₃R es independiente de la activación de caspasas, como han demostrado estudios realizados con inhibidores de las mismas. Además cuando las células carecen de InsP₃R, el citocromo c no puede migrar al RE y unirse al InsP₃R por lo que se observa sólo en el citosol. Por lo tanto, pequeñas cantidades de citocromo c liberado en las primeras etapas de la apoptosis pueden alterar el contenido reticular de Ca²⁺. Además la liberación global de citocromo c por todas las mitocondrias permite alcanzar su concentración citosólica necesaria para la activación de las caspasas y la puesta en marcha de toda la cascada apoptótica. Así puede explicarse que la liberación de citocromo c sea gradual durante el proceso apoptótico tal y como sugieren autores como Okazaki y Hausmann (Okazaki y col., 1998; Hausmann y col., 2000), o coordinada

DISCUSIÓN

desde todas las mitocondrias a la vez como apuntaba Goldstein (Goldstein y col., 2000).

Que en nuestro modelo pueda estar teniendo lugar un goteo de Ca^{2+} desde el RE y que en esta organela esté disminuyendo la concentración de este ión, parece razonable puesto que las células tratadas con ouabaína respondían menos a pulsos de histamina que las células control, tanto en el número de células que lo hacían como en la magnitud de la señal de Ca^{2+} registrada en el citosol, ya que la cantidad del Ca^{2+} liberada desde del RE era también menor.

El hecho de que la ouabaína resulte tóxica y desencadene la apoptosis celular a concentraciones en el rango nanomolar tiene un interés mayor que el meramente farmacológico, si consideramos que el plasma humano contiene ouabaína endógena (Kawamura y col., 1999) y también la corteza adrenal y el hipotálamo son particularmente ricos en este digitálico. Las concentraciones circulantes de ouabaína y de otros compuestos similares en humanos y en perros están alrededor de $0,2 \mu\text{M}$, concentración muy parecida a la que alcanzan en sangre otras hormonas esteroideas (Bauer y col., 2005). Recientemente algunos autores han puesto estas afirmaciones en tela de juicio ya que el aislamiento en muestras humanas de lo que se ha considerado hasta la fecha como ouabaína endógena con una composición idéntica a la vegetal, parece no serlo tanto y necesita nuevos estudios. Además existe una gran variabilidad en la cantidad de ouabaína endógena de

DISCUSIÓN

unos individuos a otros y la capacidad de las glándulas adrenales para secretarla también está siendo cuestionada (Nicholls y col., 2009).

La ouabaína endógena se ha planteado como un factor importante a considerar en enfermedades cardiovasculares (Nicholls y col., 2009); además puede ser que sus efectos pro-apoptóticos jueguen un papel relevante en la reparación tisular tras un daño isquémico o un insulto inflamatorio. Estos datos son consistentes con el hecho de que los esteroides cardiotónicos inducen la síntesis de colágeno y por lo tanto podrían acelerar la cicatrización de heridas (El-Okdi y col., 2008) y que además la ouabaína ha demostrado un efecto cardioprotector en ratas, protegiendo al corazón frente a una reperfusión isquémica, por un mecanismo independiente de la inhibición de la bomba Na^+/K^+ ATPasa pero ligado a la activación de una cascada de señalización mediada por ella (D'Urso y col., 2008; Pasdois y col., 2007; Pierre y col., 2007). Numerosos investigadores se centran en la actualidad en los esteroides cardiotónicos como posibles fármacos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Khan y col., 2009), incluso en los que son resistentes al tratamiento quimioterápico, empleando como diana la subunidad α_1 de la bomba Na^+/K^+ ATPasa (Mijatovic y col., 2012).

Nuestros resultados son compatibles con la siguiente secuencia de eventos:

DISCUSIÓN

1. La ouabaína se une a la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática y el complejo formado se internaliza.
2. Se produce la co-localización del complejo con la mitocondria.
3. Se producen algunos cambios en la mitocondria: pierde su estructura reticular característica y modifica su distribución en el interior celular.
4. El contenido celular de ATP se reduce y la viabilidad celular se ve comprometida.
5. Se produce la salida del citocromo c desde la mitocondria al citosol.
6. Se pone en marcha la vía intrínseca de la apoptosis con la activación de la caspasa-9, iniciadora de la misma.
7. La caspasa-9 a su vez activa a las caspasas -3 y -7, efectoras de la apoptosis. Toda la maquinaria apoptótica se activa de forma irreversible.
8. Además en la literatura encontramos que la caspasa-3 rompe el $\text{InsP}_3\text{R1}$ del RE provocando un goteo constante de Ca^{2+} desde este depósito al citosol, que contribuye a aumentar a la apoptosis celular.
9. Por otra parte, el citocromo c liberado al citosol, amplifica la señal apoptótica mediada por Ca^{2+} ya que aumenta su liberación desde el RE al unirse al InsP_3R .

VI. Conclusiones

CONCLUSIONES

De los experimentos realizados y los resultados obtenidos, podemos extraer las siguientes conclusiones (**Figura 63**):

1. La ouabaína se une a la bomba Na^+/K^+ ATPasa de la membrana plasmática en el mismo sitio en el que lo hace la digoxina.
2. Como resultado se produce la internalización del digitálico de forma paulatina.
3. Tras internalizarse, la ouabaína se dirige a la mitocondria donde provoca cambios en la morfología de esta organela y en el potencial de membrana mitocondrial.
4. La lesión mitocondrial va acompañada de una significativa caída del 40% en el contenido celular de ATP. Además, se produce la salida de un 65% del citocromo c, de la mitocondria al citosol.
5. También se produce una activación significativa de la caspasa -9, pero no de la -8.
6. La caspasa-9 activa a su vez a las caspasas -3 y -7. El compuesto Z-LEHD-FMK revierte la activación de la caspasa-9 y la posterior apoptosis ouabaínica.
7. Las células tratadas responden en menor número a pulsos de histamina (sólo un 20% responden). Además la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_c$, tras el pulso de histamina, muestra unos

CONCLUSIONES

picos y unas áreas bajo la curva significativamente menores que la de las células exentas de tratamiento.

8. Tras 24 h de exposición a concentraciones crecientes del digitálico, se produce un daño celular apoptótico que alcanza su máximo con la concentración 0,3 μM de ouabaína. Dicha apoptosis alcanza un valor del 40-50%, que no aumenta ni con mayores concentraciones del digitálico ni con tiempos de exposición más largos. Esta apoptosis va acompañada de una disminución significativa de la viabilidad celular.

Las conclusiones se resumen en la figura que sigue.

CONCLUSIONES

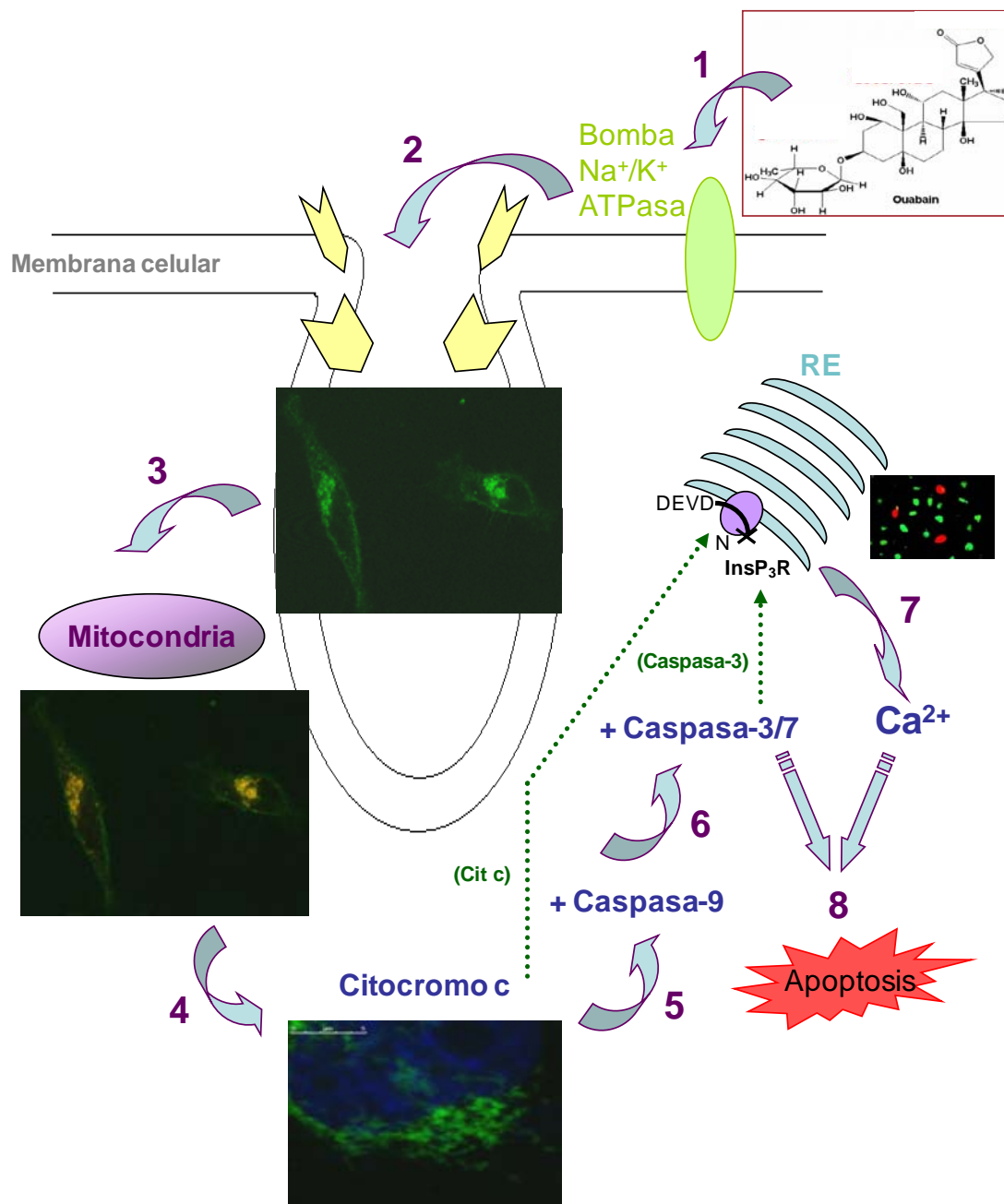


Figura 63. Esquema de las conclusiones recogidas en éste capítulo.

CONCLUSIONES

VII. Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abramowitz J, Dai C, Hirschi KK, Dmitrieva RI, Doris PA, Liu L, Allen JC. 2003. Ouabain- and Marinobufagenin-Induced Proliferation of Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cells and a Rat Vascular Smooth Muscle Cell Line, A7r5. *Circulation* 108:3048-3053.
- Aizman O, Lal M, Brismar H, Aperia A. 2001. Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:13420-13424.
- Akimova OA, Bagrov AY, Lopina OD, Kamernitsky AV, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN. 2005. Cardiotonic Steroids Differentially Affect Intracellular Na^+ and $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -independent Signaling in C7-MDCK Cells. *Journal of Biological Chemistry* 280:832-839.
- Akimova OA, Hamet P, Orlov SN. 2008. $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ -independent death of ouabain-treated renal epithelial cells is not mediated by Na^+, K^+ -ATPase internalization and de novo gene expression. *Pflugers Arch* 455:711-719.
- Arce MP, Rodríguez-Franco MI, González-Muñoz GC, Pérez C, López B, Villarroja M, López MG, García AG, Conde S. 2009. Neuroprotective and Cholinergic Properties of Multifunctional Glutamic Acid Derivatives for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* 52:7249-7257.
- Assefa Z, Bultynck G, Szlufcik K, Nadif Kasri N, Vermassen E, Goris J, Missiaen L, Callewaert G, Parys JB, De Smedt H. 2004. Caspase-3-induced Truncation of Type 1 Inositol Trisphosphate Receptor Accelerates Apoptotic Cell Death and Induces Inositol Trisphosphate-independent Calcium Release during Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 279:43227-43236.
- Aunis D, García A. 1981 Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and $[^3\text{H}]$ -ouabain binding to plasma membranes. *Br J Pharmacol* 72:31-40.
- Bachurin SO, Shevtsova EP, Kireeva EG, Oxenkrug GF, Sablin SO. 2003. Mitochondria as a Target for Neurotoxins and Neuroprotective Agents. *Annals of the New York Academy of Sciences* 993:334-344.
- Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. 2009. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 61:9-38.
- Bantsev V, Sivak JG. 2005 Confocal laser scanning microscopy imaging of dynamic TMRE movement in the mitochondria of epithelial and superficial cortical fiber cells of bovine lenses. *Mol Vis* 14:518-523.
- Barwe SP, Anilkumar G, Moon SY, Zheng Y, Whitelegge JP, Rajasekaran SA, Rajasekaran AK. 2005. Novel role for Na, K -ATPase in phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppression of cell motility. *Mol Biol Cell* 16:1082-1094.
- Bauer N, Muller-Ehmsen J, Kramer U, Hambarchian N, Zobel C, Schwinger RHG, Neu H, Kirch U, Grunbaum E-G, Schoner W. 2005. Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on Physical Exercise in Humans and Dogs: Effects of β -Blockade and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. *Hypertension* 45:1024-1028.
- Bedner E, Li X, Gorczyca W, Melamed MR, Darzynkiewicz Z. 1999. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 35:181-195.

BIBLIOGRAFÍA

- Berridge MJ. 1998. Neuronal Calcium Signaling. *Neuron* 21:13-26.
- Berridge MJ. 2003. Cardiac calcium signalling. *Biochem Soc Trans* 31:930-933.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.
- Blanco G, Mercer RW. 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 275:F633-F650.
- Blaustein MP. 1993. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 264:C1367-C1387.
- Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. 2003. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 5:1051-1061.
- Brini M, Miuzzo M, Pierobon N, Negro A, Sorgato MC. 2005. The prion protein and its paralogue Doppel affect calcium signaling in Chinese hamster ovary cells. *Mol Biol Cell* 16:2799-2808.
- Camello C, Lomax R, Petersen OH, Tepikin AV. 2002. Calcium leak from intracellular stores--the enigma of calcium signalling. *Cell Calcium* 32:355-361.
- Cano-Abad Ma.F, Villarroya M, García-Cardena AG, Gabilan NH, Lázaro MG. 2001. Calcium Entry through L-type Calcium Channels Causes Mitochondrial Disruption and Chromaffin Cell Death. *Journal of Biological Chemistry* 276:39695-39704.
- Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2002. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* 21:1616-1627.
- Collins TJ, Bootman MD. 2003. Mitochondria are morphologically heterogeneous within cells. *J Exp Biol* 206:1993-2000.
- Crompton M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341:233-249.
- Chalmers S, McCarron JG. 2008. The mitochondrial membrane potential and Ca²⁺ oscillations in smooth muscle. *J Cell Sci* 121:75-85.
- Chinnaiyan AM. 1999. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1:5-15.
- D'Urso G, Frascarelli S, Zucchi R, Biver T, Montali U. 2008. Cardioprotection by ouabain and digoxin in perfused rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 52:333-337.

BIBLIOGRAFÍA

- de los Ríos Cb, Egea J, Marco-Contelles J, León R, Samadi A, Iriepa I, Moraleda I, Gállvez E, García AG, López MG, Villarroya M, Romero A. Synthesis, Inhibitory Activity of Cholinesterases, and Neuroprotective Profile of Novel 1,8-Naphthyridine Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* 53:5129-5143.
- Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89:271-277.
- Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392:933-936.
- El-Okdi N, Smaili S, Raju V, Shidyak A, Gupta S, Fedorova L, Elkareh J, Periyasamy S, Shapiro AP, Kahaleh MB, Malhotra D, Xie Z, Chin KV, Shapiro JL. 2008. Effects of cardiotonic steroids on dermal collagen synthesis and wound healing. *Journal of Applied Physiology* 105:30-36.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 35:495-516.
- Feng J, Lingrel JB. 1994. Analysis of amino acid residues in the H5-H6 transmembrane and extracellular domains of Na,K-ATPase alpha subunit identifies threonine 797 as a determinant of ouabain sensitivity. *Biochemistry* 33:4218-4224.
- Furman GI, Sills J, Zeltzer P, Warden J. 1995. Visual diagnosis casebook. Kasabach-Merritt syndrome. *J Perinatol* 15:242-245.
- García AG, García-De-Diego AM, Gandía L, Borges R, García-Sancho J. 2006. Calcium Signaling and Exocytosis in Adrenal Chromaffin Cells. *Physiological Reviews* 86:1093-1131.
- Garcia AG, Kirpekar SM. 1973a. Release of noradrenaline from slices of cat spleen by pre-treatment with calcium, strontium and barium. *The Journal of Physiology* 235:693-713.
- Garcia AG, Kirpekar SM. 1973b. Release of noradrenaline from the cat spleen by sodium deprivation. *Br J Pharmacol* 47:729-747.
- Gilbert MS, Rupnow BA, Ramirez DA, Trisler KD, Knox SJ. 1996a. Over-expression of Bcl-2 protects against apoptosis induced by the bioreductive cytotoxic drug SR4233 (Tirapazamine). *Cell Death Differ* 3:215-222.
- Gilbert MS, Saad AH, Rupnow BA, Knox SJ. 1996b. Association of BCL-2 with membrane hyperpolarization and radioresistance. *J Cell Physiol* 168:114-122.
- Golden WC, Martin LJ. 2006. Low-dose ouabain protects against excitotoxic apoptosis and up-regulates nuclear Bcl-2 in vivo. *Neuroscience* 137:133-144.
- Goldstein JC, Kluck RM, Green DR. 2000a. A single cell analysis of apoptosis. Ordering the apoptotic phenotype. *Ann N Y Acad Sci* 926:132-141.
- Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR. 2000b. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2:156-162.

BIBLIOGRAFÍA

- Gurtu V, Kain SR, Zhang G. 1997. Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis. *Anal Biochem* 251:98-102.
- Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW. 1998. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94:339-352.
- Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, DuCharme DW, Harris DW, Mandel F, Mathews WR, Ludens JH. 1991. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6259-6263.
- Hanson CJ, Bootman MD, Roderick HL. 2004. Cell Signalling: IP3 Receptors Channel Calcium into Cell Death. *Current Biology* 14:R933-R935.
- Hausmann G, O'Reilly LA, van Driel R, Beaumont JG, Strasser A, Adams JM, Huang DC. 2000. Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol* 149:623-634.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. 2004. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *EMBO J* 23:2134-2145.
- Hirota J, Michikawa T, Natsume T, Furuichi T, Mikoshiba K. 1999. Calmodulin inhibits inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release through the purified and reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1. *FEBS Lett* 456:322-326.
- Isaev NK, Stelmashook EV, Halle A, Harms C, Lautenschlager M, Weih M, Dirnagl U, Victorov IV, Zorov DB. 2000. Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity in cultured rat cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium. *Neuroscience Letters* 283:41-44.
- Jormalainen M, Vento AE, Wartiovaara-Kautto U, Suojaranta-Ylinen R, Lauronen J, Paavonen T, Petaja J. 2007. Antithrombin reduces pulmonary hypertension during reperfusion after cardiopulmonary bypass in a pig. *Acta Anaesthesiol Scand* 51:178-188.
- Juhaszova M, Blaustein MP. 1997. Na⁺ pump low and high ouabain affinity alpha subunit isoforms are differently distributed in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1800-1805.
- Kawamura A, Guo J, Itagaki Y, Bell C, Wang Y, Hauptert GT, Jr., Magil S, Gallagher RT, Berova N, Nakanishi K. 1999. On the structure of endogenous ouabain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6654-6659.
- Koike T, Martin DP, Johnson EMJ. 1989. Role of Ca²⁺ channels in the ability of membrane depolarization to prevent neuronal death induced by trophic-factor deprivation: evidence that levels of internal Ca²⁺ determine nerve growth factor dependence of sympathetic ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6421-6425.
- Kulikov A, Eva A, Kirch U, Boldyrev A, Scheiner-Bobis G. 2007. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768:1691-1702.

BIBLIOGRAFÍA

- Li J, Zelenin S, Aperia A, Aizman O. 2006. Low Doses of Ouabain Protect from Serum Deprivation-Triggered Apoptosis and Stimulate Kidney Cell Proliferation via Activation of NF- κ B. *Journal of the American Society of Nephrology* 17:1848-1857.
- Lingrel JB. 1992. Na,K-ATPase: isoform structure, function, and expression. *J Bioenerg Biomembr* 24:263-270.
- Lingrel JB, Kuntzweiler T. 1994. Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 269:19659-19662.
- Lingrel JB, Van Huysse J, O'Brien W, Jewell-Motz E, Askew R, Schultheis P. 1994a. Structure-function studies of the Na,K-ATPase. *Kidney Int Suppl* 44:S32-39.
- Lingrel JB, Van Huysse J, O'Brien W, Jewell-Motz E, Schultheis P. 1994b. Na,K-ATPase: structure-function studies. *Ren Physiol Biochem* 17:198-200.
- Liu J, Periyasamy SM, Gunning W, Fedorova OV, Bagrov AY, Malhotra D, Xie Z, Shapiro JJ. 2002. Effects of cardiac glycosides on sodium pump expression and function in LLC-PK1 and MDCK cells. *Kidney Int* 62:2118-2125.
- Liu L, Abramowitz J, Askari A, Allen JC. 2004. Role of caveolae in ouabain-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells of the synthetic phenotype. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 287:H2173-H2182.
- Liu S, Li Y, Gao X, Yan JH, Chen ZJ. 2010a. Changes in the distribution of mitochondria before and after in vitro maturation of human oocytes and the effect of in vitro maturation on mitochondria distribution. *Fertil Steril* 93:1550-1555.
- Liu Y, Kintner DB, Begum G, Algharabli J, Cengiz P, Shull GE, Liu XJ, Sun D. 2010b. Endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling and mitochondrial Cyt c release in astrocytes following oxygen and glucose deprivation. *J Neurochem* 114:1436-1446.
- Low SY, Tan BS, Choo HL, Tiong KH, Khoo AS, Leong CO. 2012. Suppression of BCL-2 synergizes cisplatin sensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* 314:166-175.
- Low W, Kasir J, Rahamimoff H. 1993. Cloning of the rat heart Na⁺-Ca²⁺ exchanger and its functional expression in HeLa cells. *FEBS Letters* 316:63-67.
- Luanpitpong S, Nimmannit U, Chanvorachote P, Leonard SS, Pongrakhananon V, Wang L, Rojanasakul Y. 2011. Hydroxyl radical mediates cisplatin-induced apoptosis in human hair follicle dermal papilla cells and keratinocytes through Bcl-2-dependent mechanism. *Apoptosis* 16:769-782.
- Ludens JH, Clark MA, DuCharme DW, Harris DW, Lutzke BS, Mandel F, Mathews WR, Sutter DM, Hamlyn JM. 1991. Purification of an endogenous digitalislike factor from human plasma for structural analysis. *Hypertension* 17:923-929.
- Mijatovic T, Dufrasne F, Kiss R. 2012. Cardiotonic steroids-mediated targeting of the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase to combat chemoresistant cancers. *Curr Med Chem* 19:627-646.

BIBLIOGRAFÍA

- Milla J, Montesinos MS, Machado JD, Borges R, Alonso E, Moreno-Ortega AJ, Cano-Abad MF, García AG, Ruiz-Nuño A. 2011 Ouabain enhances exocytosis through the regulation of calcium handling by the endoplasmic reticulum of chromaffin cells. . Cell Calcium (resubmitting with answers to the referees).
- Miyakawa-Naito A, UhlÃ©n P, Lal M, Aizman O, Mikoshiba K, Brismar H, Zelenin S, Aperia A. 2003. Cell Signaling Microdomain with Na,K-ATPase and Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Generates Calcium Oscillations. *Journal of Biological Chemistry* 278:50355-50361.
- Mogi M, Ozeki N, Nakamura H, Togari A. 2004. Dual roles for NF-[kappa]B activation in osteoblastic cells by serum deprivation: osteoblastic apoptosis and cell-cycle arrest. *Bone* 35:507-516.
- Mohammadi K, Liu L, Tian J, Kometiani P, Xie Z, Askari A. 2003. Positive inotropic effect of ouabain on isolated heart is accompanied by activation of signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2. *J Cardiovasc Pharmacol* 41:609-614.
- Montero M, Alonso MT, Carnicero E, Cuchillo-Ibanez I, Albillos A, Garcia AG, Garcia-Sancho J, Alvarez J. 2000. Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca²⁺ transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2:57-61.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65:55-63.
- Nakanishi C, Toi M. 2005. Nuclear factor-[kappa]B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 5:297-309.
- Nakayama H, Nakashima T. 2004. [Calcium signaling mediated by nicotine receptors in neurons]. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 24:49-54.
- Nakayama T, Hattori M, Uchida K, Nakamura T, Tateishi Y, Bannai H, Iwai M, Michikawa T, Inoue T, Mikoshiba K. 2004. The regulatory domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is necessary to keep the channel domain closed: possible physiological significance of specific cleavage by caspase 3. *Biochem J* 377:299-307.
- Newton AJ, Kirchhausen T, Murthy VN. 2006. Inhibition of dynamin completely blocks compensatory synaptic vesicle endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17955-17960.
- Nicolau SM, de Diego AMG, CortÃ©s L, Egea J, GonzÃ¡lez JC, Mosquera M, LÃ³pez MG, HernÃ¡ndez-Guijo JsM, GarcÃ­a AG. 2009. Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺-Exchanger Blocker CGP37157 Protects against Chromaffin Cell Death Elicited by Veratridine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 330:844-854.
- Nicolau SM, Egea J, LÃ³pez MG, GarcÃ­a AG. 2010. Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, a new target for neuroprotection in rat hippocampal slices. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 400:140-144.
- Nicolier M, Decrion-barthod A-ZI, Launay S, PrÃ©tet J-L, Mougin C. 2009. Spatiotemporal activation of caspase-dependent and -independent pathways in staurosporine-induced apoptosis of p53wt and p53mt human cervical carcinoma cells. *Biology of the Cell* 101:455-467.

BIBLIOGRAFÍA

- Nicholls MG, Lewis LK, Yandle TG, Lord G, McKinnon W, Hilton PJ. 2009. Ouabain, a circulating hormone secreted by the adrenals, is pivotal in cardiovascular disease. Fact or fantasy? *Journal of Hypertension* 27:3-8 10.1097/HJH.1090b1013e32831101d32831101.
- Niles AL, Moravec RA, Eric Hesselberth P, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. 2007. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Analytical Biochemistry* 366:197-206.
- Oakes SA, Scorrano L, Opferman JT, Bassik MC, Nishino M, Pozzan T, Korsmeyer SJ. 2005. Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:105-110.
- Okazaki M, Ishibashi Y, Asoh S, Ohta S. 1998. Overexpressed mitochondrial hinge protein, a cytochrome c-binding protein, accelerates apoptosis by enhancing the release of cytochrome c from mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 243:131-136.
- Orlov S, Thorin-Trescases N, Pchejetski D, Taurin S, Farhat N, Tremblay J, Thorin E, Hamet P. 2004. Na⁺/K⁺ pump and endothelial cell survival: [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of [Na⁺]_i. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 448:335-345.
- Orlov SN, Dulin NO, Gagnon F, Gekle M, Douglas JG, Schwartz JH, Hamet P. 1999. Purinergic Modulation of Na⁺ and K⁺ Cotransport and MAP Kinases is Limited to C11-MDCK Cells Resembling Intercalated Cells from Collecting Ducts. *Journal of Membrane Biology* 172:225-234.
- Orlov SN, Hamet P. 2006. The death of cardiotoxic steroid-treated cells: evidence of Na⁺/K⁺-independent H⁺-sensitive signalling. *Acta Physiologica* 187:231-240.
- Palasis M, Kuntzweiler TA, Arguello JM, Lingrel JB. 1996. Ouabain interactions with the H5-H6 hairpin of the Na,K-ATPase reveal a possible inhibition mechanism via the cation binding domain. *J Biol Chem* 271:14176-14182.
- Pasdois P, Quinlan CL, Rissa A, Tariosse L, Vinassa Ba, Costa ADT, Pierre SV, Dos Santos P, Garlid KD. 2007. Ouabain protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via pathway involving src kinase, mitoKATP, and ROS. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 292:H1470-H1478.
- Pchejetski D, Taurin S, Der Sarkissian S, Lopina OD, Pshezhetsky AV, Tremblay J, deBlois D, Hamet P, Orlov SN. 2003. Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase by ouabain triggers epithelial cell death independently of inversion of the [Na⁺]_i/[K⁺]_i ratio. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301:735-744.
- Pierre SV, Yang C, Yuan Z, Seminerio J, Mouas C, Garlid KD, Dos-Santos P, Xie Z. 2007. Ouabain triggers preconditioning through activation of the Na⁺/K⁺-ATPase signaling cascade in rat hearts. *Cardiovasc Res* 73:488-496.
- Price EM, Lingrel JB. 1988. Structure-function relationships in the Na,K-ATPase alpha subunit: site-directed mutagenesis of glutamine-111 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme. *Biochemistry* 27:8400-8408.

BIBLIOGRAFÍA

- Ramirez-Ortega M, Maldonado-Lagunas V, Melendez-Zajgla J, Carrillo-Hernandez JF, Pastelín-Hernandez G, Picazo-Picazo O, Ceballos-Reyes G. 2006. Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis. *European Journal of Pharmacology* 534:71-76.
- Repke K, Portius HJ. 1963. On the identity of the ion-pumping-ATPase in the cell membrane of the myocardium with a digitalis receptor. *Experientia* 19:452-458.
- Rizzuto R, Pinton P, Brini M, Chiesa A, Filippin L, Pozzan T. 1999. Mitochondria as biosensors of calcium microdomains. *Cell Calcium* 26:193-200.
- Rizzuto R, Pozzan T. 2006. Microdomains of Intracellular Ca^{2+} : Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Reviews* 86:369-408.
- Rizzuto R, Simpson AWM, Brini M, Pozzan T. 1992. Rapid changes of mitochondrial Ca^{2+} revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* 358:325-327.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23:2861-2874.
- Scheiner-Bobis G, Schoner W. 2001. A fresh facet for ouabain action. *Nat Med* 7:1288-1289.
- Schwartz A, Grupp G, Wallick E, Grupp IL, Ball WJ, Jr. 1988. Role of the $\text{Na}^{+}\text{K}^{+}$ -ATPase in the cardiotoxic action of cardiac glycosides. *Prog Clin Biol Res* 268B:321-338.
- Singh RD, Puri V, Valiyaveetil JT, Marks DL, Bittman R, Pagano RE. 2003. Selective Caveolin-1-dependent Endocytosis of Glycosphingolipids. *Mol Biol Cell* 14:3254-3265.
- Skou JC. 1989. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. 1957. *Biochim Biophys Acta* 1000:439-446.
- Skou JC. 1998. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Journal of the American Society of Nephrology* 9:2170-2177.
- Skou JC, Esmann M. 1992. The Na,K -ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24:249-261.
- Smith KR, Leonard D, McDonald JD, Tesfaigzi Y. 2011. Inflammation, mucous cell metaplasia, and Bcl-2 expression in response to inhaled lipopolysaccharide aerosol and effect of rolapram. *Toxicol Appl Pharmacol* 253:253-260.
- Spugnini EP, Biroccio A, De Mori R, Scarsella M, D'Angelo C, Baldi A, Leonetti C. 2011. Electroporation increases antitumoral efficacy of the bcl-2 antisense G3139 and chemotherapy in a human melanoma xenograft. *J Transl Med* 9:125.
- Synek S, Pac L, Synkova M. 2007. [Transmissing electron microscopy of the vitreo-macular border in clinically significant diabetic macular edema]. *Cesk Slov Oftalmol* 63:350-354.
- Szluafcik K, Missiaen L, Parys JB, Callewaert G, De Smedt H. 2006. Uncoupled IP_3 receptor can function as a Ca^{2+} -leak channel: cell biological and pathological consequences. *Biol Cell* 98:1-14.

BIBLIOGRAFÍA

- Thors L, Eriksson J, Fowler CJ. 2007. Inhibition of the cellular uptake of anandamide by genistein and its analogue daidzein in cells with different levels of fatty acid amide hydrolase-driven uptake. *British Journal of Pharmacology* 152:744-750.
- Tian J, Liu J, Garlid KD, Shapiro JJ, Xie Z. 2003. Involvement of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species in the inotropic action of ouabain on cardiac myocytes. A potential role for mitochondrial K(ATP) channels. *Mol Cell Biochem* 242:181-187.
- Vasilets LA, Ohta T, Noguchi S, Kawamura M, Schwarz W. 1993. Voltage-dependent inhibition of the sodium pump by external sodium: species differences and possible role of the N-terminus of the alpha-subunit. *Eur Biophys J* 21:433-443.
- Vasilets LA, Schwarz W. 1993. Structure-function relationships of cation binding in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1154:201-222.
- Villalobos C, Nunez L, Montero M, Garcia AG, Alonso MT, Chamero P, Alvarez J, Garcia-Sancho J. 2002. Redistribution of Ca²⁺ among cytosol and organella during stimulation of bovine chromaffin cells. *FASEB J* 16:343-353.
- Wallick ET, Schwartz A. 1988. Interaction of cardiac glycosides with Na⁺,K⁺-ATPase. *Methods Enzymol* 156:201-213.
- Wang XQ, Yu SP. 2005. Novel regulation of Na⁺, K⁺-ATPase by Src tyrosine kinases in cortical neurons. *Journal of Neurochemistry* 93:1515-1523.
- Xie Z, Cai T. 2003. Na⁺-K⁺-ATPase-Mediated Signal Transduction: From Protein Interaction to Cellular Function. *Molecular Interventions* 3:157-168.
- Yoda S, Sarraf AM, Yoda A. 1975. Structure-activity relationships of cardiotonic steroids for the inhibition of sodium- and potassium-dependent adenosine triphosphatase. IV. Dissociation rate constants for complexes of the enzyme with cardiac oligodigitoxides. *Mol Pharmacol* 11:647-652.
- Yuan Z, Cai T, Tian J, , Ivanov AV, Giovannucci DR, Xie Z. 2005. Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP₃ receptor into a calcium-regulatory complex. *Mol Biol Cell* 16:4034-4045.
- Zeiss CJ. 2003. The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Veterinary Pathology Online* 40:481-495.
- Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. 1997. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 23:525-531.
- Zhang S, Malmersjö S, Li J, Ando H, Aizman O, Uhlir P, Mikoshiba K, Aperia A. 2006. Distinct Role of the N-terminal Tail of the Na,K-ATPase Catalytic Subunit as a Signal Transducer. *Journal of Biological Chemistry* 281:21954-21962.
- Zhou X, Jiang G, Zhao A, Bondeva T, Hirszel P, Balla T. 2001. Inhibition of Na,K-ATPase Activates PI3 Kinase and Inhibits Apoptosis in LLC-PK1 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285:46-51.

